

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA.

**FACTORES PRONÓSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA
INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDÍA Y DEL
ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON OTROS
PARÁMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS.**



X-53-3733 66-1

TESIS DOCTORAL

M^a PILAR SAN MIGUEL FRAILE.

Julio, 1998.



BIBLIOTECA



HOSPITAL RAMON Y CAJAL

AREA SANITARIA 4
28034 MADRID

D^a ROSARIO CARRILLO GIJON, Médico Adjunto del Servicio de Anatomía
Patológica del Hospital "Ramón y Cajal" de Madrid

CERTIFICA:

Que D^a Pilar San Miguel Fraile ha realizado bajo mi dirección el trabajo
titulado: "Factores pronósticos en el rhabdomyosarcoma infantil. Estudio comparativo
de la ploidía y del índice de proliferación celular con otros parámetros clínicos e
histológicos", que presenta los requisitos necesarios para su defensa.

Madrid, 19 de Junio de 1998-06-19

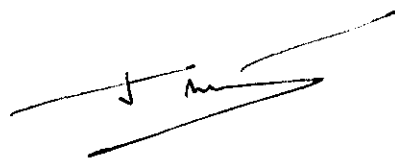
Fdo.- Dra. Carrillo Gijón

D. JOSE LUIS RODRIGUEZ PERALTO, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que Doña Pilar San Miguel Fraile ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "FACTORES PRONOSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDIA Y DEL INDICE DE PROLIFERACION CELULAR CON OTROS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS", que a mi juicio reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

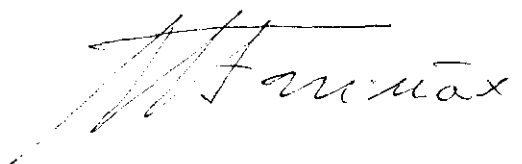
Y para que así conste firmo el presente en Madrid a 24 de Junio de 1998



Prof. J.L. Rodríguez Peralto

Dña. Juliana Fariña González, Catedrático de Anatomía Patológica y Tutor del trabajo denominado "FACTORES PRONOSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDIA Y DEL INDICE DE PROLIFERACION CELULAR CON OTROS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS", realizado por Dña. María Pilar San Miguel Fraile, y dirigido por los Dres. Dña. Rosario Carrillo Gijón y D. Jose Luis Rodriguez Peralto, cumple las condiciones científicas por lo que considera que puede ser defendido para optar al grado de Doctor.

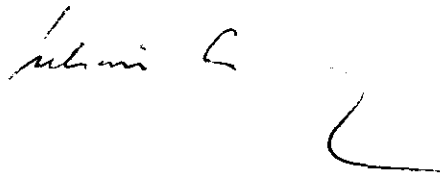
Madrid, 25 - Mayo - 1998



FDO.: JULIANA FARIÑA GONZALEZ

D. Julián Sanz Esponera, Catedrático Director del Departamento de Anatomía Patológica informa que, el trabajo denominado "FACTORES PRONOSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDIA Y DEL INDICE DE PROLIFERACION CELULAR CON OTROS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS", realizado por Dña. María Pilar San Miguel Fraile, y dirigido por los Dres. Dña. Rosario Carrillo Gijón y D. Jose Luis Rodriguez Peralto, cumple las condiciones científicas por lo que considera que puede ser defendido para optar al grado de Doctor.

Madrid, 25 - Mayo - 1998



FDO.: JULIAN SANZ ESPONERA

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas a las que me gustaría agradecerle la ayuda que me han prestado.

En primer lugar quiero agradecer a los directores de esta tesis, Rosario Carrillo Gijón y José Luis Rodríguez Peralto, el que lo hayan sido y que hayan volcado toda su capacidad de trabajo para que este proyecto pudiera acabarse. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y el apoyo que me habéis prestado.

Al Dr. Victor Abaira, de la Unidad de Bioestadística por su inestimable colaboración en la ejecución e interpretación del estudio estadístico, gracias a su paciencia y profundos conocimientos en Bioestadística ha sido posible extraer la mayoría de las conclusiones de este trabajo.

Al Dr. Fernando González Palacios, por haber sido un verdadero maestro y amigo durante mis años de residencia en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, estimulando siempre con su ejemplo mi vocación.

A las Dras. Mercedes García Villanueva y Carmen Bellas, por su ayuda y por los valiosos consejos que me han proporcionado a lo largo de toda la residencia.

A mis compañeros de residencia: Antonio, Magdalena, José Luis, Charo y Mónica, por su constante apoyo, ayuda y amistad. Ellos serán los artífices de que esta etapa de mi vida, en la que ha habido momentos duros y largas horas de trabajo la recuerde con ilusión y cariño.

A Dña Valvanera Martínez Arrieta ATS del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal que realizó la extracción y preparación de los núcleos para la cuantificación del ADN. Su gran experiencia, dedicación y pericia técnica aportaron la base técnica fiable indispensable en este tipo de estudios.

Al personal de secretaría y técnico del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal y especialmente a Dña Carmen López, Rosa Ocaña y Carmen Massa, que con su generosa contribución técnica en el estudio inmunohistoquímico e histológico han hecho viable este proyecto.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. El sitio donde me he formado, donde he realizado gran parte de este trabajo y que es mi casa desde hace casi cinco años. Quisiera agradecer a todo su personal, el apoyo que de ellos he recibido.

Al Servicio de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. En especial, a la Sección de Oncología Pediátrica (Dr. Muñoz Villa y Dra. Maldonado), por su estrecha colaboración en la recogida de datos clínicos.

Al Hospital 12 de Octubre y en especial a su servicio de Anatomía Patológica del que he recibido todo tipo de facilidades para obtener datos y contar con su material de archivo.

Finalmente, a toda mi familia y amigos, pero especialmente a Curro por su inagotable paciencia, y a mis padres y a mi hermana por su incondicional apoyo.

Muchas gracias a todos.

Pilar

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN.

El **rabdomiosarcoma** (RMS) es el sarcoma de partes blandas más frecuente en niños y adolescentes (Enzinger, 1995), supone el 4-8% de los tumores malignos en la infancia (Sutow, 1970; Young, 1975; Kramer, 1983; Maurer, 1991; Raney, 1993; Harms, 1995) y tiene un comportamiento clínico variable y una representación histológica diversa.

Aunque la supervivencia en el RMS infantil ha mejorado notablemente con el empleo de tratamientos combinados, todavía existe un porcentaje alto de recidivas y evoluciones fatales, sobre todo entre los casos irreseccables (Maurer, 1988; Maurer, 1993). Las características clínicas e histológicas no son suficientes para prever el pronóstico en todos los casos (Neifeld, 1979; Gehan, 1981; Newton, 1988; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Maurer, 1993; Pappo (B), 1995); por eso, en los últimos años se están buscando nuevos datos pronósticos que permitan predecir la respuesta a la quimioterapia y, por lo tanto, propiciar tratamientos más selectivos, que mejoren la supervivencia de estos pacientes.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los únicos factores con influencia pronóstica reconocida en este tumor eran: **el tipo histológico, el estadio clínico, el tamaño, la localización y la edad** (Jaffe, 1973; Ransom, 1977; Maurer, 1981; Gehan, 1981; Raney, 1981; Wharam, 1986). Sin embargo, en los últimos años se ha venido investigando también la influencia de la **ploidía y la actividad proliferativa**, cuya importancia pronóstica ya ha sido demostrada en otros tumores malignos infantiles, como el neuroblastoma (Look, 1984) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Look, 1985).

Trabajos previos han demostrado una estrecha relación entre tipo histológico y ploidía (Shapiro, 1991; Kilpatrick, 1994; De Zen, 1997), observando que los RMSs de tipo

embrionario mayoritariamente son hiperdiploides y los alveolares tetraploides. Además, algunos autores han observado que la ploidía es la variable que mejor predice la respuesta a la quimioterapia, que es superior en los casos hiperdiploides que en los tetraploides y diploides (Shapiro, 1991; Pappo, 1993; Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997). La posibilidad de predecir la respuesta a la quimioterapia ofrece una enorme esperanza de mejorar el tratamiento del RMS. Si estos resultados se confirmaran, podrían emplearse tratamientos más agresivos en los casos diploides, mientras que los aneuploides podrán beneficiarse de una quimioterapia más conservadora. La actividad proliferativa en los RMSs (Shapiro, 1991; Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997; Noguchi 1997) se ha estudiado relativamente poco y con resultados contradictorios.

Desde la descripción del RMS por Arthur Purdy Stout (Stout, 1946) hasta nuestros días se ha avanzado mucho en el conocimiento de las características histológicas, biológicas y clínicas del RMS, así como en su tratamiento. En cuanto a la histogénesis, tradicionalmente se consideró que el RMS tenía un origen en el músculo esquelético (Stout, 1946), mientras que actualmente se piensa que es una neoplasia mesenquimal primitiva con diferenciación muscular (Coffin (A), 1997). En cualquier caso, el RMS es una neoplasia con una marcada heterogeneidad histológica, lo que unido a la diversidad de las series, dificulta la creación de una clasificación histológica universal, que permita relacionar adecuadamente los criterios morfológicos con la agresividad clínica y evolución del enfermo.

Con el presente estudio se ha intentado contribuir al conocimiento del RMS, analizando algunos aspectos todavía confusos, como la clasificación histológica y el comportamiento biológico. El objetivo principal ha consistido en evaluar el valor pronóstico del contenido

de ácido desoxirribonucleico (ADN) y del índice de proliferación celular (IPC) y, mediante un estudio estadístico multivariable, compararlo con el de los factores pronósticos clásicos.

I.1.- REVISIÓN HISTÓRICA Y CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS.

En 1946 Arthur Purdy Stout (Stout, 1946) describió, bajo el término de RMS, una nueva variante de sarcoma con origen en el músculo esquelético estriado.

Durante los años 50 fueron apareciendo sucesivas publicaciones sobre estos tumores, la mayoría con un pequeño número de casos, que describieron la variante botrioides (Mostofi, 1952; Ober, 1954; Horn, 1955; Farinacci 1956), embrionaria (Stobbe, 1950) y alveolar (Riopelle, 1956); pero fueron Horn y Enterline (Horn, 1958) los que definieron con precisión las características del RMS y lo clasificaron según criterios clínicos e histológicos.

I.1.1.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CLÁSICA.

Horn y Enterline (Horn, 1958) reconocieron cuatro tipos histológicos: **pleomórfico, alveolar, embrionario y botrioides** (Tabla I-I).

1.-RMS pleomórfico: Stout en 1946 (Stout, 1946) describió esta variante, anteriormente denominada RMS clásico, como un tumor de células fusiformes, muy pleomórficas, frecuentemente multinucleadas, con citoplasma eosinófilo y estriaciones transversales ocasionales, que se disponían formando un sincitio. Esta neoplasia muestra marcada predilección por las extremidades inferiores de personas adultas y se comporta como una masa tumoral de crecimiento rápido, con elevado índice de recidivas y frecuentes

metástasis a pulmón y ganglios linfáticos.

2.-**RMS alveolar:** Tumor que fue descrito por Riopelle y Thériault (Riopelle, 1956) en 1956 y denominado alveolar por su característico aspecto histológico. Aunque presenta cierta variabilidad morfológica siempre se suele observar una interrelación entre el estroma y las células neoplásicas. Estas células son redondeadas o poligonales de diferentes tamaños, algunas de ellas gigantes y con estriaciones longitudinales o transversales, y se disponen alrededor de ejes de tejido conectivo con vascularización variable, remedando a tumores de estirpe epitelial, especialmente adenocarcinomas. La localización es diversa y suele presentarse en adolescentes o adultos jóvenes. La agresividad clínica es semejante a la del RMS pleomórfico.

3.- **RMS embrionario:** En 1950 Stobbe y Dargeon (Stobbe, 1950) describieron las características morfológicas de la variante embrionaria. En su forma más típica son neoplasias sólidas constituidas por células fusiformes, con núcleo único central y abundante citoplasma eosinófilo. Otras veces predomina una población celular predominantemente pequeña e indiferenciada, intercalada con otras células de mayor tamaño, que tienen un núcleo pequeño, oval, con abundante citoplasma eosinófilo y escasas estriaciones transversales. El estroma en general es escaso, con cierta tendencia a la degeneración mixoide. Son tumores de niños y adolescentes que afectan a la cabeza y el cuello, especialmente la órbita, y al tracto urogenital.

4.- **RMS botrioide:** En 1955 Horn (Horn, 1955) describió las características morfológicas del RMS botrioide, considerado una variante del RMS embrionario. Macroscópicamente son tumores vegetantes, multilobulados, con aspecto de racimo de uvas. El aspecto histológico de este tumor es característico, y está constituido por masas polipoides,

edematosas y muy poco celulares en el centro que están revestidas por la membrana mucosa del lugar de origen. Una característica histológica esencial para su diagnóstico, no siempre bien desarrollada, es la presencia de una banda de células tumorales, situada inmediatamente por debajo de la mucosa llamada “capa de cambio” de Nicholson (Nicholson, 1950). Estas células son fusiformes y monomorfas, con moderada cantidad de citoplasma y se disponen paralelas a la superficie del pólipo. Las mitosis pueden ser abundantes. La edad media de presentación es inferior a la de otros RMSs, y se localiza exclusivamente en la submucosa de cavidades.

Esta clasificación (Horn, 1958), que supuso el primer intento de gradación histológica en el RMS, tuvo una gran aceptación, manteniéndose durante largo tiempo en vigencia. Fue adoptada por la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** (Enzinger, 1969; Agamandis, 1986) y el **Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)** (Newton, 1988; Crist, 1990; Asmar, 1994; Crist, 1995; Newton, 1995). Pero a pesar de su gran difusión, su aplicación en la rutina diagnóstica carecía de una implicación pronóstica y una gradación histológica bien definida.

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CONVENCIONAL	
➤	RMS embrionario.
➤	RMS botrioide.
➤	RMS alveolar.
➤	RMS pleomórfico.

Tabla I-I.- Clasificación histológica clásica.

I.1.2.- CLASIFICACIÓN CITO HISTOLÓGICA.

Así se establecieron las bases para posteriores sistemas de gradación, como la **clasificación citohistológica** creada por **Palmer** (Palmer, 1981; Palmer, 1982), en la que se empleó la atipia nuclear como principal criterio y se identificaron dos subtipos de mal pronóstico: el monomorfo y el anaplásico (Tabla I-II). Esta clasificación citohistológica tuvo escasa aceptación, probablemente debido a la diferente valoración histológica, con respecto a los otros sistemas (OMS, IRS I) que definían constantemente el tipo alveolar y embrionario.

El problema para establecer una correcta clasificación histológica, que permitiera dividir a los pacientes en diferentes grupos de riesgo, persistió durante mucho tiempo, en gran parte debido a la relativa rareza de estos tumores, a su falta de uniformidad histológica (González -Crussi, 1979) y finalmente a la gran diversidad de factores con influencia pronóstica: localización, edad, terapéutica y estadio clínico.

CLASIFICACIÓN CITO HISTOLÓGICA	
➤	RMS anaplásico
➤	RMS monomorfo
➤	Otros: * RMS indiferenciado * RMS inclasificable * RMS mixto

Tabla I-II.- Clasificación citohistológica, propuesta por Palmer.

I.1.3.- GRUPOS COOPERATIVOS DE ESTUDIO DEL RABDOMIOSARCOMA.

Todo ello propició la creación de grandes grupos cooperativos de estudio como el **inter-Americano** (IRS I-II-III) (Maurer, 1977; Maurer, 1981; Gehan 1981; Lawrence, 1987; Newton, 1988; Maurer, 1988; Maurer, 1989; Crist, 1990; Parham, 1991; Kodet, 1993; Maurer, 1993; Newton, 1995; Crist, 1995; Kodet, 1997) y el **inter-Europeo** (SIOP) (Flamant, 1984; Flamant, 1985; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Rodary, 1991; Reboult-Marty, 1991; Flamant, 1991) que intentaron:

- Reclutar casos de forma conjunta para introducir la *aleatorización* en los estudios.
- Aumentar la supervivencia de los pacientes.
- Mejorar su calidad de vida reduciendo las secuelas del tratamiento.
- Investigar nuevos factores pronósticos.
- Establecer una clasificación histológica universal con implicación pronóstica.

I.1.3.1.- INTERGROUP RHABDOMYOSARCOMA STUDY I Y II.

A) OBJETIVOS Y CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.

El **Intergroup Rhabdomyosarcoma Study** es una organización anglo-americana constituida por tres grandes asociaciones (Children's Cancer Study Group, Pediatric Oncology Group y United Kingdom Children's Cancer Study Group) que pretende integrar los RMSs de diferentes centros de referencia con el objetivo de diseñar estudios experimentales multidisciplinarios. El IRS en sus trabajos I (Gerson, 1978; Maurer, 1988) y II (Newton, 1988; Crist, 1990; Maurer, 1993), que empezaron en 1972 y 1978 respectivamente, aceptaron la clasificación convencional (Horn, 1958) con la adición de subcategorías para las formas de **sarcoma indiferenciado** (inicialmente llamado sarcoma

de células pequeñas tipo indeterminado), **sarcoma inclasificable** (cuando la escasa cantidad o calidad del tejido impide una clasificación más precisa) y **sarcoma de Ewing extraóseo** (EOE), que ya había sido descrito (Angervall, 1975) (Tabla I-III).

CATEGORIAS ADICIONALES DEL IRS-I Y EL IRS-II.
➤ EOE
➤ Sarcoma de célula pequeña, tipo indeterminado.
➤ Sarcoma no clasificable.

Tabla I-III.- Categorías adicionales a la clasificación histológica convencional.

B) APORTACIONES DEL IRS.

Las aportaciones de estos trabajos I y II del IRS se pueden resumir de la manera siguiente:

- Son los primeros estudios (Newton, 1988) importantes dirigidos a comprobar la relación entre el patrón histológico y el curso clínico. Revisan 1782 casos y los clasifican según la clasificación convencional modificada en: alveolar, embrionario, botrioide, pleomórfico, indiferenciado y EOE. Encuentran una clara relación con el pronóstico, siendo la supervivencia a los tres años del 53% para los tipos histológicos alveolar e indiferenciado, 68% para el embrionario, 75% en el EOE y RMS pleomórfico y del 88% para el RMS botrioide.
- Observan que la distribución de las diferentes variantes histológicas difiere sustancialmente de acuerdo a la localización primaria del tumor. La mayoría de los tumores del aparato genitourinario son embrionarios (71%) o botrioides (20%), mientras que los tumores de extremidades son alveolares (50%) o embrionarios (24%).

- Es el primer gran comité que busca una clasificación pronóstica internacional, sugiriendo la importancia que podría tener la inmunohistoquímica (IHQ) para su desarrollo.
- Por último, la filosofía del IRS fue establecer protocolos terapéuticos multidisciplinarios empleando una quimioterapia inicial más agresiva, con el objetivo de aumentar la supervivencia global de estos pacientes y disminuir las secuelas físicas y funcionales.

I.1.3.2.- SOCIEDAD INTERNACIONAL DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA.

A) OBJETIVOS Y CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.

La **Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP)** (Flamant, 1984; Flamant, 1985; Rodary, 1988; Calliaud, 1989; Rodary, 1991; Reboult-Marty, 1991; Flamant, 1991) abordó un estudio multidisciplinario realizado por colaboradores europeos, entre 1975 y 1983, que pretendía comparar el tratamiento con quimioterapia antes y después del tratamiento local definitivo. Su otro objetivo era mejorar la clasificación histológica convencional; sus criterios fueron diferentes a los empleados en otras clasificaciones y se basaron fundamentalmente en el grado de diferenciación celular, como ya se había descrito anteriormente en la literatura (Schmidt, 1986) (Tabla I-IV).

CLASIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA	
➤	Sarcoma embrionario.
➤	RMS embrionario.
◊	<i>Laxo.</i>
	* <i>Botrioide</i>
	* <i>No botrioide.</i>
◊	<i>Denso.</i>
	* <i>Pobremente diferenciado.</i>
	* <i>Bien diferenciado.</i>
◊	<i>Alveolar.</i>
◊	<i>No especificado.</i>
➤	RMS pleomórfico del adulto.
➤	Otros sarcomas de partes blandas especificado.
➤	Sarcomas no especificados.

Tabla I-IV.- Clasificación histológica de los RMSs según la SIOP.

Este ensayo clínico analizó 513 RMSs del Registro Europeo de Tumores Pediátricos y aunque ninguna de las dos opciones terapéutica mostró mejores resultados, los pacientes que recibieron quimioterapia inicial seguida de tratamiento local dirigido a la masa residual consiguieron similar supervivencia pero con menos secuelas importantes (Flamant, 1984). Además, observaron un mejor pronóstico en el RMS botrioide laxo y RMS bien diferenciado denso que en el RMS no botrioide laxo, el RMS denso pobremente diferenciado y el RMS alveolar.

B) ENSAYOS TERAPEÚTICOS.

El primer ensayo de la SIOP se realizó entre 1975 y 1984 y los resultados aparecieron en los estudios **MMT 84** (1975-1984) (Flamant, 1984), **MMT 89** (1989-1994) (Carli, 1993) y

MMT 95 (iniciado el 1 de Julio de 1995) en los cuales se investigó, al igual que en el IRS, el uso de protocolos de quimioterapia inicial más agresiva y la restricción del tratamiento local (cirugía y radioterapia) agresivo.

Las aportaciones de estos dos estudios cooperativos han contribuido extraordinariamente a desarrollar nuevas clasificaciones histológicas y distintas modalidades terapéuticas multidisciplinarias en los pacientes con este tumor. Los objetivos con que se iniciaron estos trabajos persisten en la actualidad en el IRS IV y el MMT 95. Estos trabajos pretenden colaborar en el diseño de un nuevo protocolo de tratamiento, especialmente para los RMSs en estadio IV.

C) ESTRATEGIA TERAPEÚTICAS DEL MMT 89.

La estrategia terapéutica empleada actualmente por el MMT 95, en función de los resultados obtenidos en el MMT 89 es la siguiente:

1) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs DE BAJO RIESGO.

❖ Criterios de inclusión.

Se incluyen en este grupo todos los tumores localizados y resecaos totalmente de cualquier localización (T1 N0 M0 o estadio I), excluyendo los RMSs alveolares.

❖ Tratamiento.

El tratamiento es en todos los casos resección quirúrgica completa y quimioterapia limitada con Vincristina y Actinomicina D.

2) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs DE RIESGO ESTÁNDAR.

❖ Criterios de inclusión. Se incluyen en este grupo:

- Tumores localizados incompletamente resecaos.

- Tumores que se extienden más allá del órgano de origen, completa o incompletamente resecados.
- En todos los casos deben estar localizados en regiones favorables (Tabla I-V) y no ser de tipo alveolar.

LOCALIZACIÓN	
FAVORABLE	DESFAVORABLE
Orbita	Extremidades
Paratesticular	Retroperitoneo
A. Gastrointestinal	Intratorácico
Próstata	Cabeza y cuello
A. Genitourinario	Partes blandas
Otros	Periné
	Oído
	Senos

Tabla I-V. Clasificación pronóstica de los RMSs según la localización. Criterios empleados por el IRS e INC.

❖ Tratamiento.

El tratamiento estándar en este grupo es quimioterapia inicial (Vincristina, Actinomicina D y Ifosfamida) con la intención de reducir el tratamiento local agresivo en los pacientes que alcanzaban la remisión completa. Los pacientes que alcanzan la remisión completa con quimioterapia no reciben cirugía agresiva. Los pacientes en remisión parcial reciben tratamiento local definitivo con radioterapia y cirugía.

3) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs DE ALTO RIESGO.

❖ Criterios de inclusión. Se incluyen en este grupo:

- Tumores con la misma extensión que el grupo anterior, pero con localización desfavorable (Tabla I-V).
- RMSs alveolares en cualquier estadio.

❖ Tratamiento.

- Cirugía inicial o biopsia y quimioterapia intensiva. Los pacientes son divididos aleatoriamente entre dos esquemas de tratamiento distintos:
 - Esquema A: Carboplatino, Epirubicina, Vincristina, Ifosfamida, Actinomicina D y Etopósido.
 - Esquema B: Ifosfamida, Vincristina y Actinomicina D.

4) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs EN ESTADIO IV.

❖ Criterios de inclusión

Tumores metastásicos en el momento del diagnóstico.

❖ Tratamiento.

En este protocolo no se contemplan las recomendaciones para este grupo. La poliquimioterapia y radioterapia personalizada, fue el tratamiento de elección en estos pacientes según sus necesidades.

5) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LAS RECAÍDAS

❖ Recaídas en RMSs de bajo riesgo y riesgo estándar.

Poliquimioterapia con: Ifosfamida, Carboplatino, Epirubicina y Etopósido.

❖ Recaídas en RMSs de alto riesgo.

Poliquimioterapia con: Epirubicina, Carboplatino, Etopósido y Vincristina.

Se pretende pues que el MMT95 investigue nuevos factores pronósticos y explore el valor terapéutico de una quimioterapia más intensiva para los RMSs en estadio IV y los

pacientes de alto riesgo sin metástasis.

I.1.4.- INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER.

A) CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.

Posteriormente, el **Instituto Nacional del Cancer (INC)** de EEUU (Tsokos, 1992) (Tabla I-VI), en un estudio también dirigido a comprobar la relación entre patrón histológico y curso clínico, clasifica a los RMSs de acuerdo con el patrón de crecimiento y las características citológicas en dos tipos básicos: **embrionario y alveolar**.

B) APORTACIONES.

Las principales aportaciones del INC fueron:

- ❑ Reconocer la variante sólida del RMS alveolar que consiste en una versión “compacta” de este tumor, constituida por células redondas con características citológicas similares a las del tipo alveolar convencional, escasa miogénesis y ausencia de patrón alveolar.
- ❑ Encontrar una clara asociación con el pronóstico. Los tumores con patrón alveolar (clásico y sólido) tienen un comportamiento muy maligno, mientras que los de patrón embrionario tienen un pronóstico más favorable.

Esta clasificación incrementó el problema diagnóstico al reconocer la variante **alveolar sólida**. Este tumor presenta semejanza en su aspecto histológico con algunos RMSs embrionarios, pero implica el mismo pronóstico desfavorable que la variante alveolar clásica.

CLASIFICACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER.	
<input type="checkbox"/>	RMS embrionario (favorable) <ul style="list-style-type: none"> • Convencional • Con características histológicas agresivas. • Pleomórfico • Leiomiomatoso
<input type="checkbox"/>	RMS alveolar (desfavorable). <ul style="list-style-type: none"> • Convencional. • Alveolar sólido.
<input type="checkbox"/>	RMS pleomórfico.
<input type="checkbox"/>	Otros.

Tabla I-VI.- Clasificación histológica del INC.

I.1.5.- OTRAS APORTACIONES HISTOLÓGICAS.

Poco después **Cavazzana** (Cavazzana, 1992) describió el **RMS embrionario de células fusiformes**. Este tumor se caracteriza por mostrar una marcada diferenciación muscular esquelética, tener bajo potencial de malignidad y localizarse preferentemente en la zona paratesticular. Según los datos publicados (Cavazzana, 1992; Leuschner, 1993; Newton, 1995), el pronóstico llamativamente favorable de este tumor justifica su separación como variante histológica en la última clasificación del IRS III (Newton, 1995) y de la OMS (Weiss, 1995).

Posteriormente **Wijnaendts** (Wijnaendts, 1994) en una revisión de 113 casos encontró una asociación estadística significativa entre la clasificación histopatológica y la supervivencia en los RMSs no parameníngeos. Mientras que el pronóstico fue favorable para el RMS de células fusiformes, botrioide y sarcoma embrionario, el tipo embrionario convencional

tuvo un pronóstico intermedio y el tipo alveolar se asoció al peor pronóstico. Según este estudio la localización parameningea es por sí misma un factor pronóstico en la predicción del riesgo de recidiva en pacientes con RMS, independiente del tipo histológico (Tabla I-VII).

	LOCALIZACIÓN	TIPO HISTOLÓGICO	PRONÓSTICO
RMS	No-parameningeo	Sarcoma embrionario	Bueno
		RMS Botriode	
		RMS de células fusiformes	
	Parameningeo	RMS embrionario	Intermedio
		RMS alveolar	Malo

Tabla I-VII. Clasificación pronóstica de los RMSs según tipo histológico y localización (Wijnaendts, 1994).

I.1.6.- INTERGROUP RHABDOMYOSARCOMA STUDY III.

A) CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.

En 1994 el **IRS-III** (Asmar, 1994) se propuso estudiar las características morfológicas asociadas a un buen o mal pronóstico en 800 RMSs, según los cuatro sistemas de clasificación histológica (Tabla I-VIII): **Sistema convencional, SIOP, INC y sistema citohistológico**. Su objetivo era encontrar una clasificación universal, verificada, reproducible y con implicaciones pronósticas que fuera aceptada por todos sus participantes.

B) APORTACIONES.

C) Las principales aportaciones de este estudio fueron las siguientes:

- El RMS embrionario con algunas áreas de aspecto alveolar, debe ser clasificado como alveolar con vistas al pronóstico.
- El EOE es una neoplasia confundida frecuentemente con el RMS pobremente diferenciado.
- Todas las clasificaciones demuestran asociación estadística con la supervivencia, pero está es más marcada cuando se emplea el sistema convencional.
- La variante sólida del RMS es un subtipo de la forma alveolar.
- La variante pleomórfica queda eliminada pues es un tipo histológico inusual en la edad pediátrica que podría ser equiparable a la variante anaplásica de RMS embrionario.

CONVENCIONAL	SIOP	NCI	CITOHISTOLÓGICO
- EOE	- EOE		
- INDIFERENCIADO	- NO ESPECIFICADO - SARCOMA EMBRIONARIO	- INCLASIFICABLE	- INDIFERENCIADO
- EMBRIONARIO	- LAXO NO BOTRIOIDE - BIFÁSICO - DENSO POBREMENTE DIFERENCIADO - DENSO BIEN DIFERENCIADO	- EMBRIONARIO CLÁSICO - EMBRIONARIO AGRESIVO - EMBRIONARIO LEIOMIOMATOSO	- MIXTO
- BOTRIOIDE	- LAXO BOTRIOIDE	- ALVEOLAR SOLIDO - OTROS	- ANAPLÁSICO
- PLEOMÓRFICO	- PLEOMÓRFICO	- PLEOMÓRFICO	
- ALVEOLAR	- ALVEOLAR MIOGÉNICO - ALVEOLAR INTERMEDIO	- ALVEOLAR MONOMÓRFICO - ALVEOLAR PLEOMÓRFICO	- MONOMÓRFICO
- INDIFERENCIADO	- ALVEOLAR PLEOMÓRFICO	-INCLASIFICABLE	- INDIFERENCIADO

Tabla I-VIII.- Comparación de los cuatro sistemas de clasificación histológica de los RMSs.

I.1.7.- NUEVA CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL.

Con este trabajo se crearon las bases para la **nueva clasificación internacional** (Tabla I-IX) desarrollada entre 1994 y 1995 por el IRS (Asmar, 1994; Newton, 1995) que reconoce cuatro tipos: 1) En la categoría de buen pronóstico están las variantes botrioide y fusocelular del RMS embrionario. 2) El grupo de pronóstico intermedio está constituido por el RMS embrionario convencional. 3) Como tipos de mal pronóstico figuran el alveolar (clásico y sólido) y el sarcoma indiferenciado. 4) El grupo de pronóstico indeterminado lo constituyen el RMS con características rabdoideas. El RMS embrionario de células fusiformes, es una variante infrecuente que equivale a la forma leiomiomatosa de la clasificación del INC (Tsokos, 1992). El sarcoma indiferenciado es fundamentalmente un diagnóstico de exclusión y el grupo 4 es una rareza, con lo que en la práctica, actualmente, la clasificación histológica de los RMSs queda reducida a tres grupos, dos de ellos constituidos por los RMSs embrionarios y el otro por los RMSs alveolares.

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE LOS RMS
Buen pronóstico. <ul style="list-style-type: none"> • RMS botrioide. • RMS de células fusiformes
Pronóstico intermedio. <ul style="list-style-type: none"> • RMS embrionario.
Mal pronóstico. <ul style="list-style-type: none"> • RMS alveolar. • Sarcoma indiferenciado.
Pronóstico incierto. <ul style="list-style-type: none"> • RMS con características rabdoideas.

Tabla I-IX.- Nueva clasificación internacional de los RMSs.

I.1.8.- CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.

La actual clasificación de la **OMS** (Weiss, 1995) es una variante de la gradación propuesta por Horn y Enterline (Horn, 1958) pero con la adición de dos nuevas categorías: **RMS embrionario de células fusiformes y ectomesenquimoma** (Tabla I-X). A pesar de su aceptación por este prestigioso comité internacional, esta clasificación de la OMS presenta dificultades de aplicación en la rutina diagnóstica.

En resumen, la gradación histológica de esta neoplasia con fines pronósticos sigue siendo motivo de controversia en la literatura, a pesar de que son numerosos los estudios que han demostrado una correlación altamente significativa entre el tipo histológico y la supervivencia (Newton, 1988; Caillaud, 1989; Crist, 1990; Tsokos, 1992; Asmar, 1994; Newton, 1995; Coffin (A), 1997).

CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.
• RMS embrionario
• RMS botrioide
• RMS de células fusiformes
• RMS alveolar
• RMS pleomórfico
• RMS con diferenciación gangliónica (ectomesenquimoma).

Tabla I-X.- Actual clasificación de la OMS.

La biología molecular ha contribuido extraordinariamente al desarrollo de una clasificación genética con implicaciones pronósticas y terapéuticas en otros tumores pediátricos como el sarcoma de Ewing y el tumor neuroectodérmico primitivo (Delattre, 1994), sin embargo en

el RMS se conocen muy poco los factores genéticos que influyen en el comportamiento biológico. Mientras que esto se logra, la clasificación internacional del RMS (Newton, 1995) ha pretendido crear un sistema morfológico, fácilmente reproducible que permita estandarizar protocolos terapéuticos y diagnósticos en función del pronóstico.

I.2.- FACTORES PRONÓSTICOS.

La supervivencia en el RMS infantil ha mejorado mucho con el empleo de tratamientos combinados. *Un dato constante en los estudios de la SIOP y el IRS anteriormente citados,* es que la supervivencia a los 5 años para este grupo de tumores ha aumentado progresivamente en las últimas décadas (desde el 25% en 1970 al 70% en 1995) (Pappo (A), 1995), pero todavía la evolución clínica del RMS es muy variable, lo que traduce la diferente respuesta a la quimioterapia que tienen unos casos frente a otros (Neifeld, 1979; Gehan, 1981; Lawrence, 1987; Newton, 1988; Rodary, 1988; Maurer, 1993; Pappo (B), 1995). En el pasado, se consideró al RMS como una enfermedad sin pautas terapéuticas bien establecidas y evolución casi siempre mortal; esto es debido a la infrecuencia de este tumor así como a la escasez de información en la literatura. En la actualidad, la aportación de nuevos protocolos terapéuticos por los grupos inter-Europeo e inter-Americano están contribuyendo extraordinariamente a la planificación de estrategias terapéuticas conservadoras así como a identificar nuevos marcadores pronósticos que mejoren sustancialmente la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes.

El pronóstico de los RMSs parece asociado a distintos factores, unos relacionados con el paciente: **edad, sexo, localización, tamaño y estadio**, y otros con las características biológicas de la neoplasia. Entre estos últimos algunos son bien conocidos como el **tipo**

histológico, otros están poco estudiados como **la ploidía y el IPC**. El efecto sobre el pronóstico del RMS que pueden tener algunos marcadores tumorales ya conocidos como la p53, mdm-2, p21 y p16 está por determinar. Es muy posible que la respuesta a la quimioterapia, y por tanto el pronóstico de los RMSs, se vea influenciada por la acción sinérgica de varios de estos factores y de otros que estén por descubrir.

I.2.1.- FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS.

I.2.1.1.-EDAD.

Tradicionalmente se ha considerado que la edad es un factor pronóstico de enorme importancia en los tumores sólidos malignos infantiles, como el neuroblastoma (Breslow, 1971; Kinnier-Wilson, 1974) y LLA (Reaman, 1985; Hammond, 1986).

La influencia de la edad en la supervivencia de los RMSs está todavía por aclarar, pero se ha demostrado suficientemente una peor respuesta a la quimioterapia en los adultos (Lloyd, 1983; De Jong, 1987; Miettinen, 1988; Prestidge, 1989; Nakleh, 1991; La Quaglia, 1994). Existe la posibilidad de que esta mala respuesta sea debida a características intrínsecas de la neoplasia o bien a una peor tolerancia al tratamiento (Lawrence, 1964; Lloyd, 1983; De Jong, 1987; Prestidge, 1989).

La mayor parte de los estudios clinicopatológicos de series infantiles amplias no han encontrado diferencia significativa en el pronóstico según la edad (Ragab, 1986; Maurer, 1988; Maurer, 1993; Mameghan, 1993; Wijnaendts, 1993; Wijnaendts, 1994; Niggli, 1994; Crist, 1995; De Zen, 1997). Sin embargo, algunos trabajos del IRS (Crist, 1990; Andrassy, 1996), de la SIOP (Rodary, 1988; Reboul-Marty, 1991) y de otros autores (Sutow, 1970; Tsokos, 1992; Kilpatrick, 1994; La Quaglia, 1994) han demostrado una influencia de la

edad en la supervivencia (Sutow, 1970; Crist, 1990; Reboul-Marty, 1991; Kilpatrick, 1994; Andrassy, 1996) y en el intervalo libre de enfermedad (ILE) (Rodary, 1988; Reboul-Marty, 1991; La Quaglia, 1994), mostrando un pronóstico más favorable los niños menores. En un sólo estudio (La Quaglia, 1994) se ha demostrado que la edad es un factor pronóstico independiente. La Quaglia (La Quaglia, 1994) en una serie amplia y homogénea de 290 RMSs, la mayor parte de ellos infantiles (85 % en menores de 21 años), demostró que la edad era un factor pronóstico independiente, estadísticamente significativo y determinante en los tumores invasivos no metastásicos. Este autor atribuye el fenómeno a la diferente respuesta a la quimioterapia, o bien a que las células neoplásicas sean biológicamente diferentes.

Por último, la relación entre la edad y el tipo histológico en el RMS está ampliamente descrita en la literatura (Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; Wijnaendts, 1994; La Quaglia, 1994; Harms, 1995; Coffin (A), 1997). Ambos parámetros siguen una distribución bimodal: los tumores embrionarios son más frecuentes en niños menores de 10 años, mientras que los alveolares predominan en niños mayores y adolescentes (Gaiger, 1981; Newton, 1988; Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; Wijnaendts, 1994; Harms, 1995; Coffin (A), 1997). Estos datos podrían justificar que la edad no sea un factor pronóstico independiente en la mayoría de las series (Ragab, 1986; Maurer, 1988; Maurer, 1993; Mameghan, 1993; Wijnaendts, 1993; Wijnaendts, 1994; Niggli, 1994; Crist, 1995; De Zen, 1997) ya que su valor pronóstico iría ligado al tipo histológico.

1.2.1.2.- SEXO.

En la mayoría de las series se aprecia un ligero predominio del sexo masculino (Newton,

1988; Maurer, 1988; Molenaar, 1988; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Reboult-Marty, 1991; Shapiro, 1991; Maurer, 1993; Enzinger, 1995; De Zen, 1997) que es más marcado en los RMSs embrionarios (Newton, 1988; Molenaar, 1988; Caillaud, 1989; Enzinger 1995), lo que podría justificar la aparente mejor evolución de este tumor en los varones. Un solo estudio del registro de la SIOP (Rodary; 1988) demostró que el sexo era un factor pronóstico independiente en los RMSs no metastásicos; según este estudio, el sexo masculino implicaría mejor pronóstico y evolución.

I.2.1.3.- LOCALIZACIÓN.

La localización del tumor se relaciona con el pronóstico en los RMSs, de tal forma que esta asociación ha permitido enunciar el concepto de **localizaciones favorables y desfavorables**. Sin embargo, no existe un acuerdo general a la hora de agrupar los casos en localizaciones favorables y desfavorables lo que dificulta extraordinariamente la comparación de los resultados entre las diferentes series. La clasificación con mayor aceptación internacional ha sido la empleada por el IRS (Sutow, 1970; Gehan, 1981; Raney, 1981), que posteriormente ha sido adoptada por el INC (Tsokos, 1992) (Tabla I-V), mientras que otros estudios multivariados de supervivencia agrupan la localización en genitourinario/resto (De Zen, 1997), o parameningeos/resto como la SIOP y otros autores (Caillaud, 1989; Rodary, 1988; Wijnaendts, 1994) (Tabla I-XI).

LOCALIZACIÓN		
Buen pronóstico	Pronóstico intermedio	Mal pronóstico
1-Orbitarios (no parameníngeos)	1-Otras localizaciones (no parameníngeos)	1-Parameníngeos
2-Vaginales		
3-Paratesticulares		

Tabla I-XI. Clasificación de la SIOP según el pronóstico y la localización.

A pesar de estas disparidades la mayor parte de los estudios que valoran la asociación entre localización y pronóstico en series amplias de RMSs muestran una correlación estadística independiente (Sutow, 1970; Neifeld, 1979; Gehan, 1981; Flamant, 1984; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Maurer, 1988; Caillaud, 1989; Crist, 1990; Rodary, 1991; Tsokos, 1992; Wijnaendts, 1994; Newton, 1995; Andrassy, 1996; Nakanishi, 1997), aún cuando los datos provengan de diferentes registros y se empleen diferentes sistemas de clasificación. Por otra parte, varios autores (Gehan, 1981; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994; Andrassy 1996) han demostrado en estudios multivariados que las localizaciones parameníngea (Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts 1994) y en extremidades (Gehan, 1981; Andrassy, 1996) son factores de mal pronóstico, independientemente del tipo histológico. Sin embargo en otros estudios clínicopatológicos, la localización no muestra repercusión pronóstica (Reboul-Marty, 1991; Pappo, 1993; Kilpatrick, 1994; De Zen, 1997). Estos datos sugieren que la localización podría estar condicionada por otros factores pronósticos, como la ploidía, el tipo histológico y el IPC:

La ploidía: Según algunos estudios la mayor parte de los tumores localizados en el aparato urogenital son hiperdiploides, mientras que los tumores tetraploides están localizados más

frecuentemente en las extremidades (De Zen, 1997). Para otros autores (Wijnaendts, 1993), la mayoría de los tumores localizados en aparato urogenital, cabeza y cuello son aneuploides, y los localizados en tórax, abdomen y extremidades son más frecuentemente diploides.

Tipo histológico: Alrededor del 70% de los tumores situados en a. genitourinario, órbita y senos paranasales son botrioides, mientras que en las extremidades predomina el tipo alveolar. (Caillaud, 1989; Enzinger, 1995; Andrassy, 1996; De Zen, 1997).

IPC: Algunos estudios demuestran que los tumores de extremidades y parameningeos tienen IPC superiores al 14% en el 90% de los casos; mientras que los tumores urogenitales y de cabeza y cuello no parameningeos tienen IPC inferiores al 14% (De Zen, 1997).

Por último, cabe resaltar que la localización es un factor pronóstico determinante en la clasificación por estadios previa al tratamiento según el sistema propuesto por el IRS (Lawrence, 1987) (Tabla I-XII) y por lo tanto es un factor decisivo para la estrategia terapéutica a seguir.

ESTADIO	DESCRIPCIÓN
I	Localización favorable, M0
II	Otra localización Ta N0 M0
III	Otra localización Tb N0, Tb N1 M0 o Ta N1 M0
IV	M1

Tabla I-XII. Clasificación del IRS según el estadio clínico previo al tratamiento.

Abreviaturas: **M0**, ausencia de metástasis. **M1**, metástasis a distancia. **T0**, sin invasión fuera del músculo de origen. **T1**, invasión fuera del músculo de origen. **N0**, sin metástasis en ganglios linfáticos regionales. **N1**, metástasis en ganglios linfáticos regionales. **a**, tamaño <5 cms. **b**, tamaño >5 cms.

I.2.1.4.- TAMAÑO.

El tamaño podría ser un factor pronóstico independiente en el RMS, junto con el estadio y la localización, según dos trabajos clínico-patológicos recientes del IRS III (Newton, 1995; Andrassy, 1996); con unos resultados que difieren de los obtenidos por el IRS en los proyectos I y II en los que no se demostró dicha asociación (Lawrence, 1987; Maurer, 1988; Crist, 1990). Posiblemente el desarrollo de las nuevas técnicas de imagen haya contribuido a una valoración más correcta del tamaño en el RMS. No obstante, es llamativa la escasez de estudios que valoran este parámetro pronóstico tan importante en otras neoplasias. La estratificación empleada por el IRS (Maurer, 1981), que es la clasificación por estadios más empleada en este tumor, no considera el tamaño en su valoración (Tabla I-XIII), a diferencia del tradicional sistema TNM/UICC (Harmer, 1982) (Tabla I-XIV). Sin embargo, es aceptado por el IRS en la clasificación por estadios previa al tratamiento, evaluando el tamaño de los tumores según sean mayores o menores de 5 cms.

I.2.1.5.- ESTADIO.

En el RMS, como en la mayoría de los tumores, el estadio clínico es un factor pronóstico de máxima importancia (Kingston, 1983; Donaldson, 1984; Pedrick, 1986; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Reboult-Marty, 1991; Gansey, 1991; Wijnaendts 1994; Newton, 1995; Crist, 1995), determina que la supervivencia del RMS a los 3 años varíe de un 48% para el estadio I a un 8% para el estadio IV (Crist 1995) según los resultados del IRS III.

De todos los métodos de estratificación en diferentes estadios, dos son los que han tenido mayor aceptación: el sistema **TNM/UICC** (Harmer, 1982) (Tabla I-XIII) de amplio uso en la SIOP (Caillaud, 1989; Reboul-Marty, 1991; Kodet, 1997) y la clasificación propuesta por el **IRS** (Tabla I-XIV) (Maurer 1975) que tiene mayor difusión y aceptación internacional (Tsokos, 1992; Mameghan, 1993; Wijnaendts, 1994; Pappo (A), 1995; Crist, 1995; De Zen, 1997).

El sistema del IRS es el método más útil para clasificar el tumor después de la resección quirúrgica, ya que valora su resección total o parcial. Sin embargo, este sistema ha sido duramente criticado en función de los consejos terapéuticos de los dos registros internacionales (Pappo (A), 1995), que recomienda una quimioterapia inicial agresiva y la restricción terapéutica local. Según estas conclusiones, es necesaria una clasificación pronóstica estricta previa al tratamiento.

Sobre la base de estos criterios, el IRS (Lawrence, 1987) adopta una modificación del sistema de clasificación TNM. Esta nueva clasificación anteriormente comentada (tabla I-XII), es sustancialmente mejor para la valoración del tumor previa al tratamiento y además introduce la localización y el tamaño como factores pronósticos determinantes en la clasificación por estadios previa a la quimioterapia (Pappo (A), 1995) (tabla I-XII).

CLASIFICACIÓN SEGÚN EL SISTEMA TNM/UICC	
ESTADIO T.	
➤ <u>T= Tumor primario.</u>	
T0: Sin evidencia de tumor primario. T1: Tumor confinado al órgano o sistema de origen. T1a: Tumor de 5 cm o menos en su dimensión máxima. T1b: Tumor de más de 5 cm en su dimensión máxima. T2: Tumor con afectación de uno o más órganos contiguos o con derrames tumorales, o múltiples tumores en el mismo órgano. T2a: Tumor de 5cm o menos en su dimensión máxima. T2b: Tumor de más de 5 cm en su dimensión máxima. Tx: No se dispone de las valoraciones mínimas necesarias.	
ESTADIO N	
➤ <u>N= Adenopatías regionales</u>	
N0: Sin evidencia de afectación linfática regional. N1: Afectación linfática regional. Nx: No se dispone de la valoración mínima necesaria. Nx debe considerarse como N0 en los estadios I y II.	
ESTADIO M	
➤ <u>M= Metástasis a distancia</u>	
M0: sin evidencia de metástasis. M1: con metástasis. Mx : no se dispone de la valoración mínima necesaria.	

Tabla I-XIII. Estadios clínicos según el sistema TNM.

En cuanto a la influencia del estadio en la evolución clínica, los estadios I y II tienen un pronóstico semejante cuando son del mismo tipo histológico, y por lo tanto podrían considerarse conjuntamente (Pappo (A), 1995; Maurer, 1988). Por otro lado, aunque los estadios III y IV tienen mucho peor pronóstico, se describe que la afectación parameningea y de extremidades confiere peor pronóstico que otras extensiones locales (Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994; Andrassy, 1996).

CLASIFICACIÓN SEGÚN EL IRS	
Estadio I.	Enfermedad localizada y reseca completamente, sin invasión de los ganglios linfáticos regionales. Dos son las opciones: Confinada al músculo o al órgano de origen. Afectación por contigüidad. Infiltración fuera del músculo o del órgano de origen, como ocurre en los planos aponeuróticos. Se incluyen en este grupo tanto la resección completa comprobada microscópicamente como la impresión macroscópica de la misma.
Estadio II.	Tumor reseca, con restos microscópicos de la enfermedad. No hay evidencia clínica o microscópica de invasión de ganglios regionales. Enfermedad regional totalmente reseca. No quedan restos microscópicos. Enfermedad regional con invasión ganglionar ampliamente reseca, pero con evidencia de restos microscópicos.
Estadio III	Resección incompleta o biopsia del tumor con restos macroscópicos importantes.
Estadio IV	Enfermedad con presencia de metástasis desde el principio.

Tabla I. XIV. Estadios clínicos después del tratamiento. Esquema del IRS.

La existencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico es un factor con gran influencia en la supervivencia y el ILE, por lo que éstas implican que el tumor sea incluido automáticamente en el estadio clínico III (Gehan, 1981; Lawrence, 1987; La Quaglia, 1994, Andrassy 1996) y constituyen por lo tanto un factor que ensombrece significativamente el pronóstico (Reboul-Marty, 1991). Las metástasis a distancia suponen el estadio clínico más avanzado y comportan por tanto el pronóstico más grave (Niggli, 1994; Wijnaendts, 1994; La Quaglia, 1994).

Finalmente algunos autores han demostrado que el estadio clínico se relaciona estadísticamente con la ploidia (Kowal-Vern, 1990) y el tipo histológico (Caillaud, 1992), de forma que los tumores aneuploides y alveolares son con más frecuencia diagnosticados en estadios III y IV.

I.2.1.6.- TIPO HISTOLÓGICO.

El RMS es un tumor muy heterogéneo y complejo morfológicamente. En general es una neoplasia fácil de diagnosticar histológicamente como entidad (Enzinger, 1995), pero con importantes problemas de subtipificación y clasificación que todavía persisten en la actualidad y que reflejan un grado considerable de superposición entre las distintas variantes histológicas y la ausencia de unos criterios morfológicos estrictos para separar cada una de ellas.

Tradicionalmente, los RMSs infantiles se han clasificado en dos grandes grupos con importancia pronóstica: el embrionario con pronóstico favorable y el alveolar con pronóstico desfavorable (Tsokos, 1992). Sin embargo, esta asociación parece desaparecer cuando se valoran otros datos pronósticos como el estadio (Maurer, 1988; Pedrick 1986) y la localización (Gehan, 1981; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994; Andrassy 1996). La nueva clasificación internacional (Newton, 1995) (tabla I-IX) considera que el tipo embrionario es histológicamente más variado y que tiene formas de buen pronóstico: botrioides y fusocelular y otras de pronóstico intermedio: embrionario convencional. Sin embargo, a pesar del indudable progreso que suponen las nuevas clasificaciones, siguen existiendo problemas para clasificar histológicamente algunos RMSs como alveolares o embrionarios, sobre todo después de la descripción (Tsokos, 1992) de la variante sólida del RMS alveolar.

Algunos autores no han encontrado diferencias pronósticas entre las distintas variantes histológicas (Jaffe, 1973; Marsden, 1976; Gehan, 1981; Bale, 1983; Suder, 1986; Rodary, 1988; De Zen, 1997). Otros demuestran una asociación estadística entre tipo histológico y ploidía, de tal forma que la mayoría de los RMSs embrionarios son hiperdiploides,

mientras que los RMSs alveolares son mayoritariamente tetraploides (Shapiro, 1991; Kilpatrick, 1994). Según estos estudios (Shapiro, 1991; Kilpatrick, 1994) la ploidía parece ser un factor pronóstico importante en los RMSs. Estos hallazgos sugieren que la ploidía en los RMS infantiles podría contribuir a clarificar el pronóstico, especialmente en los casos difíciles de tipificar histológicamente (Kilpatrick 1994).

Recientemente, Coffin (Coffin (B), 1997) y anteriormente otros autores (Molenaar, 1984; d'Amore, 1994) han sugerido en series pequeñas, que la citodiferenciación rabdomioblástica postquimioterapia en los RMSs, podría ser un indicador de buen pronóstico. Estos resultados deberán confirmarse en posteriores estudios con series más amplias.

1.2.2.- OTROS FACTORES PRONÓSTICOS.

El conocimiento que se tiene acerca de las características biológicas de los sarcomas de partes blandas, y en concreto del RMS, es aun muy limitado. No obstante, parece que la histología, base fundamental del diagnóstico, no permite predecir por sí sola el comportamiento biológico de este tumor. La ploidía, actividad proliferativa y diferentes marcadores celulares han sido recientemente incorporado como técnicas de estudio en el RMS. El principal objetivo de los estudios con estos nuevos marcadores biológicos y citométricos es determinar su valor como criterios diagnósticos y pronósticos.

1.2.2.1.- PLOIDÍA.

1.2.2.1.1.- CICLO CELULAR.

El ciclo celular tiene como objetivo final la duplicación de la información genética de una

célula para, una vez conseguida, repartirla con precisión absoluta, generando dos células hijas idénticas a la progenitora.

La división celular comprende dos periodos: **la interfase o fase de síntesis** (fase-S), en la que se produce la duplicación del ADN y **la división o fase de multiplicación** (fase-M) (que tiene lugar por mitosis, meiosis u otros mecanismos de duplicación celular), en la que se produce un reparto equitativo de los diferentes componentes celulares (Fig. I-1). En la interfase se distinguen tres periodos fundamentales:

Fase G₁ que es aquella etapa de la interfase que precede a la síntesis del ADN, por ello las células en este periodo se preparan para la entrada en la fase S y presentan un contenido de ADN diploide (2n).

Fase S que es el periodo de síntesis del ADN, por lo que el contenido de ADN nuclear oscilará entre diploide (2n) y tetraploide (4n).

Fase G₂ que es el periodo comprendido entre la fase S y la mitosis. En esta etapa las células presentan una cantidad de ADN tetraploide (4n).

Posteriormente se produce la **mitosis** que ocurre en distintos periodos: **Profase**, en la que los cromosomas se condensan; **prometafase** en la que los cromosomas se reorientan terminando en **metafase**; **anafase**, durante la cual, los cromosomas se dividen en dos partes iguales y se separan y **telofase** en la que los núcleos se reconstruyen. Después de la mitosis las células hijas entran nuevamente en el periodo de quiescencia o fase G₀, que corresponde pues a un estado de células en reposo.

En las células que se encuentran en proliferación, estas cuatro fases se suceden de forma continua, ordenada y sujeta a una estricta regulación mediante los puntos de control y restricción (Sherr, 1994; Nurse, 1994) (Fig I-1). La pérdida de regulación del ciclo celular

ocasionará la transformación maligna, que se caracteriza básicamente por una proliferación celular incontrolada y una pérdida de la diferenciación celular (Cohen, 1990; Preston-Martin, 1990).

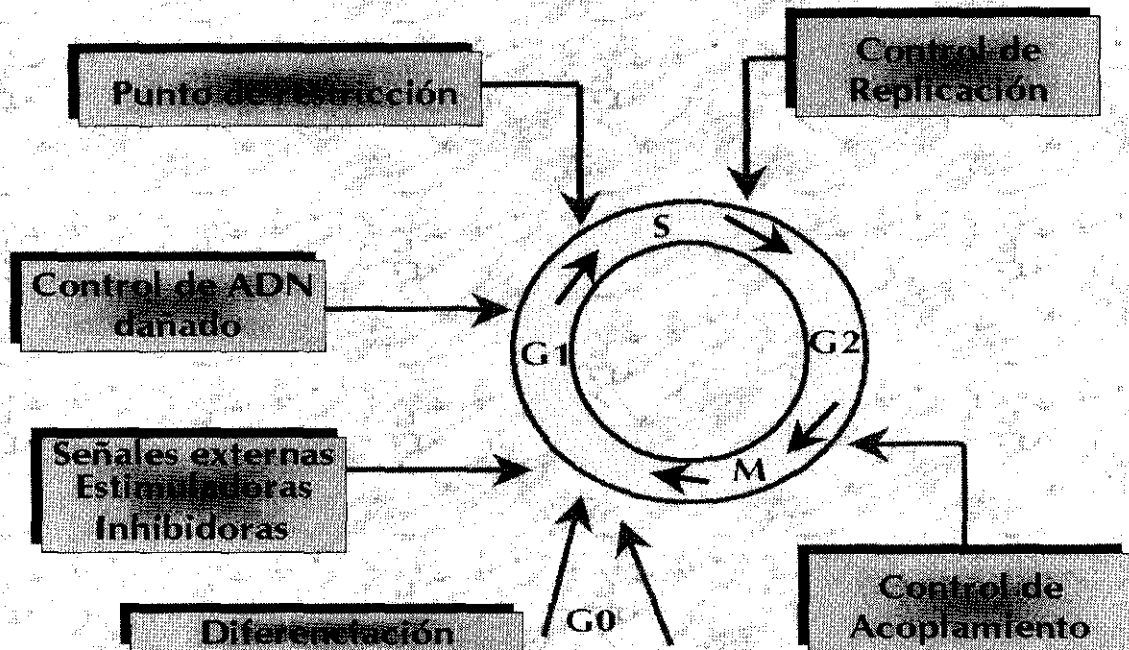


Fig.I-1. Fases del ciclo celular y posición de los principales puntos de control y restricción.

La incorporación de la cuantificación del ADN por citometría de imagen o de flujo al arsenal diagnóstico y pronóstico está aumentando nuestra capacidad para valorar la agresividad de los tumores y diseñar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces.

1.2.2.1.2.- CITOMETRÍA DE FLUJO Y CITOMETRÍA ESTÁTICA.

La citometría estática (CME) y la citometría de flujo (CMF) son las dos técnicas citofotométricas que permiten cuantificar diferentes sustancias químicas celulares. Los dos

fenómenos ópticos en que se basan son la absorción y la fluorescencia respectivamente.

La citometría de absorción, se basa en la captación de energía luminosa de una determinada longitud de onda por parte de diferentes grupos químicos coloreados. En la tinción se deben emplear reacciones químicas estequiométricas, en las que la intensidad de la tinción del producto final sea proporcional a la cantidad de sustancia a detectar (Rost, 1980).

La citometría de fluorescencia se basa en la cuantificación de la fluorescencia emitida por diversos grupos químicos celulares marcados con un fluorocromo, de forma que el tamaño del impulso fluorescente sea proporcional a la cantidad de la sustancia química analizada.

En el campo de la patología tumoral humana, uno de los componentes celulares más analizado por citometría ha sido el contenido nuclear de ADN. Los estudios en este campo son numerosísimos y encaminados en su mayor parte a determinar si dicho contenido de ADN constituye un factor determinante del pronóstico de los tumores. Existen numerosos trabajos que demuestran que la ploidía es un factor pronóstico objetivo, fiable y reproducible en una amplia gama de tumores (Friedlander, 1984; Zimmerman, 1987; Dressler, 1987; Joensuu, 1990; Bauer, 1993; Wijnaendts, 1993).

Para la determinación del ADN nuclear en CME la tinción estequiométrica más utilizada es la de Feulgen (Koss, 1989; Grace, 1993). En CMF, el fluorocromo más utilizado para cuantificar el ADN es el yoduro de propidio (Darzynkiewicz, 1984).

La CME ó de imagen es una técnica interactiva con la que se puede medir el contenido de ADN de células aisladas teñidas con Feulgen. Para obtener resultados válidos las medidas deben de hacerse en extensiones citológicas y no en cortes histológicos para evitar medir secciones de núcleos en vez de núcleos enteros.

El operador selecciona visualmente los núcleos para la determinación automática de su densidad óptica y contenido de ADN. Después de que cada elemento es medido los datos son recogidos y almacenados por el ordenador para generar un histograma con el contenido de ADN de todos los núcleos analizados.

El índice de ADN (DI) para una población de células medida con CME es el cociente:

$$\frac{\text{ADN de las células tumorales seleccionadas}}{\text{ADN de las células normales seleccionadas}}$$

La obtención de un histograma válido requiere al menos 100-200 núcleos tumorales y un control interno de 20-40 núcleos de células normales diploides.

La CMF utiliza núcleos marcados con un fluorocromo para medir su contenido de ADN a partir de la fluorescencia que emiten. Con este método, la obtención de un histograma válido requiere la medida de 10-20000 núcleos, pues cantidades menores no producen valores estadísticamente significativos (Leader, 1994). Las muestras analizadas en CMF son suspensiones celulares.

El aparato realiza las medidas automáticamente, por lo que debe estar sujeto a rigurosos controles tecnológicos. Además, con cada batería de muestras medidas se deben incluir controles con tejidos normales diploides humanos. También se requiere que el coeficiente de variación de las poblaciones detectadas no sea superior al 10%, lo que refleja la anchura del pico dibujado en el histograma (Leader, 1994).

El DI en CMF se obtiene con el cociente:

$$\frac{\text{ADN de las células en el segundo pico}}{\text{ADN de las células en el primer pico}}$$

La introducción de la técnica de Hedley para extracción de núcleos a partir de bloques de parafina supuso un gran empuje para el desarrollo de la citometría de ADN en patología tumoral, pues posibilitó la realización de estudios retrospectivos en grandes series, con casos en los que se conocía la evolución. De esta forma se ha podido investigar ampliamente el contenido de ADN de muchos tumores y el papel de la ploidía en su diagnóstico y pronóstico (Murphy, 1986; Hedley, 1987; Clark, 1989; Merkel, 1990; Bosari, 1993; Susini, 1994; Vesalainen, 1994; Carmichael, 1995).

Las principales ventajas de la CMF estriban en su carácter totalmente automático que supone una gran rapidez de la medición (más de 1000 células/segundo), capacidad de analizar un gran número de células y una significación estadística alta. El gran número de núcleos analizados permite además estudiar el ciclo celular, cuantificando la fase S y G₂ M. La principal ventaja de la CME deriva de su carácter interactivo por lo que el operador tiene un control visual de los elementos que mide. Esto permite detectar pequeñas poblaciones aberrantes que pasan desapercibidas en CMF, por lo que su sensibilidad a la aneuploidía es superior (Merkel, 1990; Bauer, 1990; Lanigan, 1993; Clemo, 1993).

Las limitaciones, ventajas y desventajas de ambas técnicas citométricas han sido ampliamente comentadas en la literatura (Koss, 1989; Joensuu, 1989; Lanigan, 1993; Kilpatrick, 1994):

CITOMETRÍA DE FLUJO.

➤ Ventajas:

- Rapidez.
- Capacidad de analizar gran número de núcleos.
- Significación estadística elevada.

- No necesita personal muy cualificado para realizar la medición.

➤ Desventajas:

- Es totalmente automática.
- Imposibilidad de observar los elementos analizados (detritus, agrupamientos celulares, etc.).
- Aparataje caro.
- Factores tisulares y de procesamientos afectan la precisión de la medición produciendo coeficientes de variación elevados que invalidan el histograma.
- Requiere mayor cantidad de tejido.
- Falta de normas estandarizadas para la interpretación de los histogramas.

CITOMETRÍA ESTÁTICA.

➤ Ventajas:

- Es interactiva.
- Conservación de la morfología de los elementos analizados, evitando células en mal estado y detritus.
- Mayor sensibilidad a la aneuploidía.
- Posibilidad de almacenar material para su utilización posterior.
- Menor requerimiento de material en cuanto al número de núcleos y menor cantidad de tejido.

➤ Desventajas:

- Gran laboriosidad lo que limita su aplicación a grandes series.

- La medición requiere una alta cualificación del personal que la realiza, ya que debe interpretar características cito-nucleares.
- Aparataje caro.
- Factores tisulares y de procesamiento afectan a la precisión de la medición y pueden producir histogramas no válidos.

I.2.2.1.3.- PLOIDÍA EN LOS TUMORES INFANTILES.

Los resultados más espectaculares en la aplicación de la cuantificación del ADN nuclear en la patología tumoral se han obtenido en el campo de los tumores infantiles, especialmente en el neuroblastoma y la leucemia linfoblástica aguda.

I.2.2.1.3.A.- PLOIDÍA EN LOS NEUROBLASTOMAS.

Desde los primeros estudios de Look en 1984 se demostró que los **neuroblastomas** con contenido de ADN aneuploide tienen una buena respuesta a la quimioterapia, incluso en estadios clínicos avanzados (Look, 1984; Gansler, 1986; Oppedal, 1988; Taylor, 1988). Desde entonces, ha sido reiteradamente comprobado que la presencia de una línea celular aneuploide predice un comportamiento clínico favorable y una buena respuesta a la quimioterapia en el neuroblastoma (Gansler, 1986). Estudios más recientes (Bourhis, 1991; Brodeur, 1992) indican que entre todos los factores significativamente asociados al pronóstico del neuroblastoma: edad, estadio clínico, índice de ADN y amplificación del oncogen N-myc, sólo los dos últimos son factores pronósticos independientes. Así pues, la determinación de la ploidía y el análisis citogenético son actualmente las dos pruebas de

mayor importancia para establecer el pronóstico en los neuroblastomas (Bourhis, 1991; Brodeur, 1992; Muraji, 1993). De esta forma, se pueden establecer tres grupos pronósticos: los tumores con contenido de ADN aneuploide, con pocos o ningún reordenamiento citogenético que tienen buen pronóstico; los tumores diploides sin anomalías citogenéticas detectadas que tienen una progresión lenta pero a menudo fatal; los tumores diploides en los que se detectan deleciones o pérdida de la heterozigosidad para el brazo corto del cromosoma 1, o amplificación del oncogen N-myc que tienen una evolución rápidamente fatal (Brodeur, 1992).

1.2.2.1.3.B.- PLOIDÍA EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.

Por lo que respecta a la LLA, el número de cromosomas en las células tumorales es conocido desde hace tiempo como el factor pronóstico independiente más importante, lo que ha convertido al cariotipo en la prueba de laboratorio más importante en estos niños, después del recuento de blastos en sangre periférica (Jackson, 1990). Los casos cuyos blastos tienen más de 51 cromosomas presentan una buena respuesta al tratamiento y esto corresponde exactamente a un índice de ADN (DI) de 1.16 (Look, 1985; Jackson, 1990). Así pues la determinación del contenido de ADN se ha convertido en una prueba analítica de primer orden en la LLA.

1.2.2.1.3.C.- PLOIDÍA EN OTROS TUMORES INFANTILES.

En otros tumores infantiles los resultados han sido menos concluyentes. Así, mientras que

en algunas series encuentran superior supervivencia en los **meduloblastomas** aneuploides (Schofield, 1992), en otros estudios la condición diploide es indicativa de una evolución clínica favorable, junto a la adecuada dosis de radiación (Zerbini, 1993).

En el **sarcoma de Ewing** el valor pronóstico de la ploidía ha sido poco estudiado y posiblemente tenga escasa repercusión en la supervivencia, dado el escaso número de tumores aneuploides que se han hallado (Dierick, 1993). Sin embargo, en el **nefroblastoma** se ha encontrado una correlación estadística entre ploidía y tipo histológico, siendo los casos de histología favorable mayoritariamente diploides, mientras los casos con anaplasia son aneuploides (Schmidt, 1986; Kumar, 1989); sin embargo, no se ha demostrado que la ploidía aporte información pronóstica suplementaria a la obtenida del tipo histológico. En el **tumor neuroectodérmico periférico** los pocos ejemplos estudiados por citometría son mayoritariamente diploides (Molenaar, 1988) y la ploidía no parece contribuir de manera importante a establecer el pronóstico (Swanson, 1992).

1.2.2.1.4.- PLOIDÍA EN LOS RABDOMIOSARCOMAS.

El carácter heterogéneo del **RMS**, tanto desde el punto de vista histológico como clínico, es un hecho que desconcierta a patólogos y clínicos desde hace mucho tiempo. No es extraño pues, que en los últimos años se investigue también la influencia de la ploidía y la actividad proliferativa en este tumor. La determinación de la ploidía en el RMS pretende principalmente aclarar la heterogeneidad biológica y pronóstica de esta neoplasia (Shapiro, 1991). El método básico para el diagnóstico del RMS es el estudio histopatológico del

tejido neoplásico. Durante años la clasificación histológica, junto a otros factores pronósticos clínicos, han sido determinantes a la hora de instaurar el tratamiento. Sin embargo, aún sumando todos estos parámetros clásicos, no se puede realizar una predicción pronóstica razonablemente segura en los RMSs; de ahí surge la necesidad de encontrar otros factores pronósticos adicionales en estos tumores.

Los estudios de ploidía en el RMS no son muy abundantes, y los resultados de los trabajos más antiguos o con series más reducidas han sido contradictorios (Boyle, 1988; Molenaar, 1988; Kowal-Vern, 1990; Leuschner, 1991; Dias, 1992; El Naggar, 1993; Kilpatrick, 1994) (Tabla I-XV). En las series más antiguas se identificaron dos grupos fundamentales de RMSs en función del contenido de ADN: diploides y aneuploides, y se sugirió la escasa utilidad pronóstica de esta técnica debido al porcentaje tan elevado de aneuploidía (Boyle, 1988; Molenaar, 1988), o bien a la gran heterogeneidad clínica e histológica de las series (Kowal-Vern, 1990, Leuschner, 1991; Dias, 1992; El Naggar, 1993; Kilpatrick, 1994). En los últimos años, trabajos más amplios han intentado determinar la susceptibilidad de la célula neoplásica a la quimioterapia (Shapiro, 1991; Pappo, 1993; Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997), en función de su contenido de ADN, de forma similar a lo realizado en el neuroblastoma.

En este sentido han sido importantes los estudios de Shapiro (Shapiro, 1991; Pappo, 1993) que demostraron una estrecha relación entre contenido de ADN, tipo histológico y pronóstico en el RMS infantil, observando que los tumores embrionarios son mayoritariamente hiperdiploides (DI comprendido entre 1.10 y 1.80); mientras que un

contenido de ADN casi-tetraploide (DI comprendido entre 1.80 y 2.60) estaba fuertemente asociado al patrón histológico alveolar. Además, demostraron que la ploidía era la variable que mejor predecía la respuesta a la quimioterapia, siendo máxima en los tumores hiperdiploides, intermedia en los tetraploides y mínima en los diploides.

En un trabajo posterior (Wijnaendts,1993), que incluye 70 RMSs infantiles se analiza, con estudio estadístico multivariable, el papel de la ploidía en la supervivencia y se confirma su valor pronóstico pero no su relación con el tipo histológico. En dos trabajos posteriores (Niggli, 1994; De Zen, 1997) se demuestra el valor pronóstico independiente del contenido de ADN en la supervivencia y en el ILE del RMS, de forma que la hiperdiploidía parece conferir el mejor pronóstico y la diploidía el peor (tabla I-XV).

Según estos estudios la ploidía aportaría una valiosa información para predecir la efectividad del tratamiento y plantear estrategias terapéuticas más o menos agresivas; ajustadas a las características de cada tumor. Se supone que la mala respuesta a la quimioterapia en los casos diploides, se debe a la baja proporción de células en proliferación (fase-S) (Shapiro, 1991).

Por otra parte, la no-disyunción cromosómica y la endoreduplicación constituyen las alteraciones genéticas más comunes encontradas en los RMSs embrionarios y alveolares respectivamente, habiéndose relacionado estas aberraciones moleculares con la hiperdiploidía de los primeros y la casi-tetraploidía de los segundos (Shapiro, 1991).

Autor/ Año	Nº casos	Estadio/T. Histológico	Edad Años	CMF/ CME	F. pronósticos (univariable)	F. pronósticos (multivariable)	Relación estadística de la ploidía con otros parámetros
Boyle/ 1988	13	I-IV /todos	<1-11	CMF	-	-	-
Molenaar /1988	11	I-IV/ todos	2-23	CMF	-	-	-
Leuschner/ 1991	66	I-IV/todos	-	CMF	-	-	-
Kowal-Vern/ 1990	23	I-IV/ todos	<1-18	CMF/ CME	Estadio	-	Estadio
Dias/ 1992	?	I-IV/todos	Todos	CMF	-	-	-
Shapiro /1991	37	III-IV/ todos	<1-20	CMF	Ploidía	Ploidía	Tipo histológico
Wijnaendts/ 1993	70	I-IV/ todos	<1-22	CMF	Ploidía Localización Estadio T. histológico	Ploidía	Localización
El-Naggar / 1993	13	I-III/ todos	18-77	CMF	-	-	-
Pappo /1993	34	III/ Embrionario	<1-18	CMF	Ploidía	Ploidía	-
Niggli /1994	81	I-IV/Todos	<1-20	CMF	Estadio Ploidía Fase S Localización Tamaño	Ploidía Estadio Fase S	Fase S
Kilpatrick /1994	26	I-IV/Todos	<1-27	CMF/C ME	Sexo Edad Estadio	Edad Estadio	T. histológico
De Zen / 1997	59	I-IV/Todos	<1-25	CMF	Ploidía IPC	Ploidía	Localización T. histológico IPC

Tabla I. XV. La ploidía como factor pronóstico en el RMS. Series publicadas en la literatura.

1.2.2.2.- ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La actividad proliferativa y su influencia en la conducta biológica de las neoplasias humanas se ha estudiado repetidamente en gran variedad de tumores, pero en los sarcomas, y en particular en el RMS, todavía se conoce de modo insuficiente (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997; Noguchi, 1997).

El método más tradicional y simple de medir la actividad proliferativa es el recuento de figuras mitóticas en el corte histológico, trabajo arduo y lento (Burger, 1986; Ellison, 1987), además de ser un método subjetivo e incompleto (Woosley, 1991; Linden, 1992) ya que valora únicamente la parte visible del ciclo celular.

Otro procedimiento empleado para el estudio de la actividad proliferativa consiste en determinar la fracción celular en **fase-S** mediante CMF, que se ha convertido en un método muy extendido en patología tumoral humana, demostrándose una importante asociación entre la presencia de una alta fracción celular en fase-S y un peor pronóstico en muchas neoplasias (Kimura,1991; Lerma,1994). Sin embargo, la CMF presenta deficiente resolución para determinar la fase S de los tumores aneuploides y aunque hay programas matemáticos desarrollados para obtenerla, todavía no se ha conseguido una homogeneidad en el método; además la CMF es una técnica cara y exige una metodología compleja, por lo que en la cuantificación de la actividad proliferativa está siendo sustituida por las modernas técnicas de inmunohistoquímica (Woosley, 1992; Linden, 1992).

Para la detección mediante IHQ de antígenos nucleares asociados a la proliferación celular, se han empleado distintos marcadores monoclonales: **Ki-67** (Gerdes, 1984) (congelación), antígeno nuclear de proliferación celular (**PCNA**) (Bravo, 1980; Morris,

1989; McCormick, 1992) y **MIB-1** (McCormick (A), 1993; McCormick (B), 1993) (parafina).

El primer marcador IHQ empleado utilizaba el anticuerpo (Ac) PC10 que detecta el antígeno (Ag) nuclear de proliferación celular **PCNA**, que es una proteína nuclear no histona, cofactor de la DNA polimerasa, y se marca con mayor intensidad en la fase S y con intensidad variable en la fases G₁, G₂ y M, lo que dificulta su correcta cuantificación (Woods, 1991; Filipe, 1993). Por otra parte, la determinación de PCNA no discrimina entre células con una fase S lenta o rápida, debido a la larga vida media de esta proteína, de ahí que en general, la fracción de núcleos positivos usando este marcador sea mayor que la fase S detectada con CMF (Yu, 1991). El marcador de proliferación más estudiado ha sido el que utiliza el Ac monoclonal **Ki-67**, que detecta una proteína no histona, presente en todas las fases del ciclo celular excepto en las fases G₀ y G₁ temprana (Brown, 1990; Gerdes, 1991; Linden, 1992), pero tenía la desventaja frente al PCNA de que sólo funcionaba sobre tejido fresco. La utilización de un nuevo Ac monoclonal, el **MIB-1**, que reacciona con el mismo epítipo antigénico que el Ki-67, pero mantiene su actividad en tejidos fijados con formol (Cattoretti, 1992; Key, 1993), ha resuelto este problema. El Ac monoclonal MIB-1 marca todos los núcleos con la misma uniformidad (McCormick (A), 1993; Kreipe 1993) y es actualmente el método de elección para determinar la actividad proliferativa de tejidos incluidos en parafina pues su expresión es más estable que la de PCNA y menos sensible que ésta a variaciones en el tiempo de fijación y otras circunstancias relacionadas con el procesamiento del tejido en parafina (Rose, 1994; Keshgegian, 1995).

La cuantificación de la actividad proliferativa del tumor una vez realizada la inmunotinción

con el marcador de proliferación, se puede realizar de diferentes formas: el método más simple es la evaluación visual aproximada de la reactividad de la inmunotinción estableciendo un grado (elevado o bajo; elevado, medio o bajo, etc) o bien el conteo visual de núcleos positivos obteniendo un porcentaje o índice. El conteo automático por análisis de imagen es el método de elección siempre que se cuente con el equipo técnico necesario. De esta forma se mejora la exactitud de la medición al evaluar un gran número de núcleos de forma rápida y precisa (Carrillo, 1997).

I.2.2.2.1.- ACTIVIDAD PROLIFERATIVA EN LOS RABDOMIOSARCOMAS.

El efecto de la actividad proliferativa tumoral en la progresión de la enfermedad o el pronóstico, se ha estudiado escasamente en los tumores de partes blandas (Ueda, 1989; Zehr, 1990; Oda, 1993; Niggli, 1994; Michie, 1994; Oshiro, 1995; Amada, 1995;) y en concreto en el RMS (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997; Noguchi, 1997) (Tabla I-XV).

Estudios	F. pronóstico	Técnica	Asociación a otros factores
Wijnaendts /1993	Si	Fase-S	-
Niggli /1994	Si	Fase-S	Tipo histológico
De Zen /1997	Si	Fase-S	Ploidía Tipo histológico
Noguchi/1997	No	MIB-1	-

Tabla I-XV. Estudios previos sobre el valor pronóstico de la actividad proliferativa en el RMS.

Algunos estudios con RMS han demostrado una relación estadística entre la fracción celular en fase S determinada por CMF y el pronóstico de los pacientes (Wijnaendts, 1993;

Niggli, 1994; De Zen, 1997). En estos trabajos, se han podido establecer de forma clara dos categorías pronósticas de acuerdo al porcentaje de células en fase-S: bajo (0-14%) con evolución favorable y alto (>14%) con evolución desfavorable. Además, el porcentaje de células en fase-S se relaciona estadísticamente con el tipo histológico (Niggli, 1994; De Zen, 1997) y la ploidía (De Zen, 1997) en el RMS. El más alto grado de proliferación celular fue encontrado en los RMSs alveolares (Niggli, 1994; De Zen, 1997) y los RMS diploides o tetraploides (De Zen, 1997).

Solamente un estudio (Noguchi, 1997) ha investigado la actividad proliferativa en los RMSs utilizando el Ac monoclonal MIB-1. En este estudio el IPC se obtuvo por contaje visual y no se observó relación estadística de la actividad proliferativa con la supervivencia y su posible relación con el ILE no se investigó. El valor pronóstico de la determinación del IPC mediante cuantificación de Ag de proliferación está todavía por determinar en series más amplias de RMS.

II.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

II.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.

Los RMSs son tumores poco frecuentes y extremadamente variables clínica e histológicamente. La supervivencia en el RMS infantil ha mejorado considerablemente con el empleo de tratamientos combinados, pero todavía existe un porcentaje alto de recidivas y casos fatales. Las características clínicas e histopatológicas no permiten prever la evolución clínica de una forma tan ajustada como sería deseable.

Por otra parte, en el diagnóstico histopatológico de estas neoplasias persisten en la actualidad problemas derivados de la diversidad de clasificaciones histológicas que existen, así como de la semejanza morfológica entre tumores con pronóstico diferente.

Estas circunstancias han favorecido la búsqueda de nuevos factores pronósticos predictivos que permitan seleccionar la estrategia terapéutica a seguir en cada caso, y así aumentar la supervivencia y disminuir las secuelas físicas y funcionales de los enfermos.

Nuestro estudio se centra en recopilar y revisar desde un punto de vista clínico-patológico una serie de RMSs y determinar el valor pronóstico de los factores clínicos e histológicos convencionales, comparándolo con el de dos posibles nuevos factores, la ploidía y el IPC. Dentro de este marco de trabajo, los objetivos concretos de la presente tesis han sido:

- 1.- Determinar el valor pronóstico que tienen en nuestra serie los factores clínicos **edad, sexo, localización y estadio clínico**, mediante estudio estadístico de su relación con la **supervivencia y con el periodo libre de enfermedad.**
- 2.- Revisar la actual **clasificación histológica** de los RMSs y analizar su valor pronóstico en nuestra serie, mediante estudio estadístico de su relación con la **supervivencia y con el periodo libre de enfermedad**

- 3.- Determinar el valor pronóstico de la **ploidía y el IPC** en nuestra serie, analizando su relación estadística con la **supervivencia y con el periodo libre de enfermedad**.

- 4.- Establecer si la **ploidía y el IPC son factores pronósticos independientes**. Si aportan información pronóstica suplementaria de la obtenida con los factores pronósticos clásicos. Para ello, se ha realizado un estudio estadístico multivariable comparando estos dos factores con los restantes parámetros clínicopatológicos analizados.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

III.1. MATERIAL.

III.1.1.- SELECCIÓN DEL MATERIAL.

El estudio retrospectivo se realizó en pacientes diagnosticados de RMS en los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal de la Universidad de Alcalá de Henares (25 casos) y del Hospital 12 de Octubre de la Universidad Complutense de Madrid (20 casos).

Se han incluido en el estudio 45 RMSs infantiles, diagnosticados desde Enero de 1979 hasta Diciembre de 1997, con seguimiento clínico hasta Marzo de 1998. La supervivencia y el ILE se calcularon desde la fecha de diagnóstico hasta el momento del éxitus o cierre del estudio. Todos los enfermos fueron tratados según el protocolo terapéutico de la SIOP vigente en el momento del diagnóstico.

III.1.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN.

Todos los casos seleccionados cumplieron los criterios que a continuación se exponen:

- ① Corresponder a pacientes menores de 22 años con el diagnóstico de RMS.
- ② Disponer de muestras de tejido neoplásico fijadas en formol e incluidas en parafina.
- ③ Obtener de este material un histograma válido del contenido de ADN de los núcleos tumorales.
- ④ Disponer de una historia clínica completa.

III. 2. MÉTODOS.

III. 2. 1. REVISIÓN CLÍNICA.

Para la revisión clínica se ha seguido un protocolo retrospectivo que recoge los siguientes parámetros:

- EDAD EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO.
- SEXO.
- LOCALIZACIÓN. Para la valoración estadística, la localización de los tumores se dividió en dos grandes grupos pronósticos: favorable y desfavorable, según los criterios empleados por el IRS (Raney 1981, Gehan 1981, Sutow 1970) y aceptados por el INC (Tsokos 1992) (Tabla I-IX).
- ESTADIO. La clasificación de los pacientes por estadios se realizó según el sistema propuesto por el IRS (Maurer 1975 y Lawrence 1987), que es una adaptación de la clasificación TNM. En todos los casos se evaluó el estadio clínico en el momento del diagnóstico y cuando ingresaron en el Hospital Ramón y Cajal ó 12 de Octubre. Para el estudio estadístico se tuvo en cuenta el estadio inicial en el momento del diagnóstico, aunque este diagnóstico se realizara en otro centro hospitalario. Los casos clasificados en las historias clínicas según el sistema TNM, se transformaron en la seguida por el IRS según la correlación reflejada en la tabla III-I, que fue la empleada en el estudio estadístico.

IRS	T	N	M
Estadio I	T1a, T1b	N0, Nx	M0
Estadio II	T2a, Tab	N0, Nx	M0
Estadio III	Cualquier T	N1	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla III-I. Correlación entre los sistemas de estadios clínicos del IRS y TNM.

- **TAMAÑO.** La valoración del tamaño, en los casos extirpados quirúrgicamente, fue siempre macroscópica, referida en tres dimensiones y en cms. El tamaño de los tumores no extirpados se valoró con las técnicas de imagen, siempre que fue posible.
- **TRATAMIENTO.** Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados siguiendo las estrategias terapéuticas de la SIOP vigentes en el momento del diagnóstico en función de la localización, estadio y tipo histológico del RMS.
- **EVOLUCIÓN.** La fuente de obtención de datos fue la historia clínica. Se actualizaron hasta Marzo de 1998 por entrevista personal con el equipo médico que trataba al enfermo o mediante contacto telefónico con la familia, siempre que fue necesario. La evolución clínica del enfermo se clasificó en uno de los siguientes apartados según la información más actualizada:
 - vivo sin evidencia de enfermedad.
 - vivo con recidiva locoregional o metástasis.
 - muerto por el tumor.
 - muerto por otras causas.

Además, se ha valorado el ILE considerando como tal el periodo de tiempo transcurrido desde el tratamiento curativo hasta la detección de la primera recidiva local, regional o metastásica.

III.2.2.- REVISIÓN HISTOLÓGICA.

Se realizó la revisión histológica y confirmación del diagnóstico inicial de todos los casos utilizando todas las secciones de parafina de las que se disponía en cada caso teñidas con hematoxilina-eosina (H&E). La diferenciación muscular fue comprobada en los casos necesarios mediante técnicas de IHQ. El subtipo histológico se determinó siguiendo la nueva clasificación internacional (tabla I-VII) (Newton 1995).

Para el estudio estadístico se agruparon en dos grandes grupos, separando los RMSs embrionarios, incluyendo los tipos botrioide y de células fusiformes, de los alveolares. Aquellos casos en los que se apreciaban los dos tipos histológicos (embrionario y alveolar), se consideraron tumores alveolares, fuera cual fuera la proporción representada por cada tipo, de acuerdo a los criterios de la nueva clasificación internacional (Newton, 1995).

III.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA PLOIDIA.

El estudio de la ploidía se realizó por CME sobre material incluido en parafina. Para ello se eligió un bloque representativo de cada tumor y se procedió a la obtención y preparación de los núcleos según los siguientes apartados:

III.2.3.1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL: El contenido de ADN de cada tumor se determinó mediante análisis de núcleos enteros obtenidos de los bloques de parafina según la técnica de Hedley modificada (Hedley, 1983). En cada caso se seleccionó un bloque de parafina representativo del tumor y en los casos necesarios se desecharon áreas hemorrágicas o las que contenían excesivo tejido no tumoral.

➤ **Extracción de núcleos a partir de bloques de parafina (técnica de Hedley).** Consta de los siguientes pasos:

- ❑ Cortar a temperatura ambiente dos o más secciones de 50 μ de cada bloque y colocar en el fondo de un tubo de ensayos el tejido recogido cuidadosamente del borde de la cuchilla.
- ❑ Hacer un corte para H&E después de los cortes de 50 μ para control morfológico de la muestra.
- ❑ Desparafinar y rehidratar el tejido según el siguiente esquema:
 - 1.- Xilol o sustituto y cambiar 3 veces con intervalos de 15 minutos.
Agitar enérgicamente el tubo durante todo este tiempo.
 - 2.- Alcohol absoluto 2 veces, 10 minutos y agitar.
 - 3.- Alcohol de 95 grados 2 veces, 10 minutos y agitar.
 - 4.- Alcohol de 80 grados 1 vez, 10 minutos y agitar.
 - 5.- Alcohol de 70 grados 1 vez, 10 minutos y agitar.
 - 6.- Alcohol de 50 grados 1 vez, se deja toda la noche y se cubren los tubos.
- ❑ Rehidratar, tratar con enzimas proteolíticas y filtrar para obtener las suspensiones nucleares según el siguiente esquema:

- 1.- Rehidratar dos veces en DPBS centrifugando durante 10 minutos a 1.500 revoluciones por minuto (rpm) a 4 grados centígrados (C°).
- 2.- Absorber el PBDS lo más posible y añadir de 2.5 a 3 ml. de pepsina a temperatura ambiente.
- 3.- Incubar en pepsina (pepsina al 0.5% en agua destilada con 5.5% de CIH 1 normal (N), llevando el pH a 1.5 con el CIH 1N) durante 20-40 minutos en baño a 37 grados C°.
- 4.- Separar mecánicamente las células del tejido aspirando y expulsando varias veces el contenido del tubo con una pipeta Pasteur.
- 5.- Colocar los tubos sobre hielo picado para detener la digestión.
- 6.- Lavar con DPBS una vez y centrifugar después.
- 7.- Añadir 2cc de DPBS y filtrar a través de un filtro milipore con poros de 32-37 micras en un tubo limpio.

Preparación de extensiones citológicas. De las suspensiones nucleares obtenidas se extraen 200 lambdas (λ), y se realizan extensiones citológicas mediante citocentrífuga durante 5 minutos a 1700 r.p.m. Las extensiones se fijan en formol tamponado al 10% durante 30 minutos y se dejan secar al aire para posteriormente proceder a la tinción de Feulgen.

III.2.3.2.- TINCIÓN DE FEULGEN.

➤ Preparación del reactivo.

- **Soluciones ácidas.**

- Clorhídrico 5N (para la hidrólisis): Añadir 431 ml. de ácido clorhídrico concentrado (35%) a 569 ml de agua destilada.

- Clorhídrico 0.1N (para preparar el reactivo de tinción): Añadir 2 ml de clorhídrico 5N a 98 ml de agua destilada.
 - Clorhídrico 0.05N (para preparar el reactivo de lavado): Añadir 3 mls de clorhídrico 5N a 297 ml de agua destilada.
 - **Solución de tinción.** En un Erlenmeyer de 125 ml poner 100 ml de clorhídrico 0.1N y añadir el contenido de un frasco de reactivo de tinción. Tapar herméticamente y agitar hasta su perfecta disolución durante una hora al menos. Al cabo de dicho tiempo filtrar cuidadosamente y lo más rápidamente posible. Debe usarse inmediatamente y desecharse al final de la tinción.
 - **Solución de lavado.** Poner 300 ml de clorhídrico 0.05N en un Erlenmeyer de 500 ml y añadir el contenido de un frasco de reactivo de lavado. Tapar herméticamente y agitar hasta su perfecta disolución. Mantener tapado hasta su utilización. Una vez preparado este reactivo es estable durante dos o tres horas. Tirar después de su utilización.
- **Técnica de Feulgen.** Se han utilizado los reactivos de tinción y lavado preparados por Bekton Dickinson®. La tinción se realizó según el siguiente esquema.
- Preparar los reactivos.
 - Colocar los portas con la muestra en ácido clorhídrico 5N e hidrolizar durante 60 minutos.
 - Sin lavar, teñir las preparaciones en el reactivo de tinción, en un recipiente tapado herméticamente y agitando muy a menudo durante 60 minutos. Preparar durante este tiempo el reactivo de lavado.

- Colocar en tres Coplin distintos 100 ml de la solución de lavado de cada uno. Pasar sin lavar la preparación al primer Coplin durante 30 segundos. Pasar entonces los cristales al segundo Coplin y lavar durante 5 minutos.
- Finalmente, pasar las preparaciones al tercer Coplin antes y durante el lavado deben permanecer tapados.
- Lavar las preparaciones en agua destilada durante 5 minutos. Cambiar el agua durante otros 5 minutos.
- Colocar las preparaciones en una solución de ácido clorhídrico al 1% en alcohol de 70° y lavar durante 5 minutos.
- Directamente desde el alcohol ácido, deshidratar las preparaciones en alcohol absoluto durante 6 minutos en dos cambios de 3 minutos cada uno.
- Aclarar en xilol en dos cambios de tres minutos cada uno.
- Montar en DePex ® según técnicas habituales.

III.2.3.3.- ANALIZADOR DE IMAGEN.

El análisis de la ploidía se realizó utilizando un **sistema computerizado de análisis de imagen**. Un analizador de imagen es un sistema que incorpora a un microscopio óptico un sistema “Hardware” (ordenador, pantalla, teclado e impresora), diseñado para aceptar programas específicos de “Software” que facilitan la medida, cuantificación y análisis de parámetros histológicos y celulares por medio de la densitometría y el análisis estadístico.

El analizador de imagen (“Hardware”) **CAS 200 ®** (Fig. III-1) consta de:

- **Microscopio óptico** modificado, al incorporar dos cámaras de televisión que producen señales en función de la longitud de onda que trasmite el microscopio al observar las muestras.

- **Ordenador** con una memoria interna de 4 Mbytes y disco duro de 80 Mbytes, con un paquete informático de “software” IBM ® de análisis celular.
- Dos **monitores** en color: un sistema de control y selección y otro de reproducción.
- **Impresora** con capacidad para gráficos.

Este analizador de imagen pertenece a la última generación de sistemas informáticos adaptados al trabajo con microscopía óptica y su utilidad principal es la de cuantificar objetivamente datos morfológicos que tradicionalmente sólo se podía estudiar de modo subjetivo.

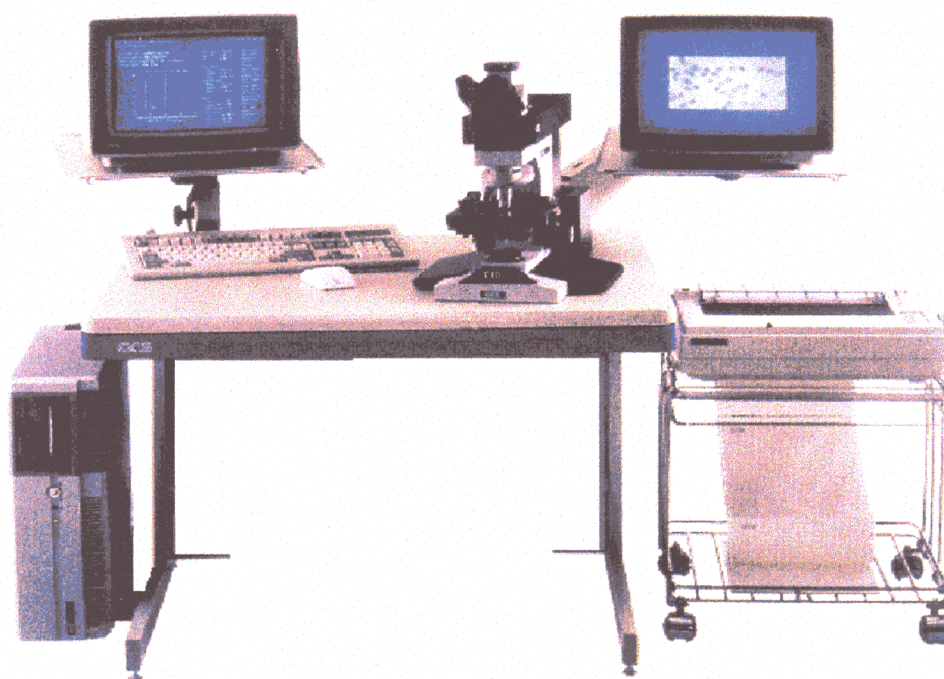


Fig III-1.- Sistema CAS® 200 para análisis de imagen.

El equipo CAS-200 ® puede analizar multitud de parámetros morfológicos y en este trabajo hemos empleado:

- El programa de análisis de ADN. “Quantitative DNA Analysis”.

- El programa de proliferación celular. "Quantitative proliferation index".

III.2.3.4.- PROGRAMA DE DETERMINACIÓN DE LA PLOIDÍA.

La cuantificación citofotométrica del ADN se realizó en el analizador de imágenes CAS-200 ®, con el programa "Quantitative DNA Analysis". En cada tumor se ha determinado el contenido de ADN en más de 150 núcleos de células tumorales. Como control interno diploide se ha valorado el ADN nuclear de al menos 20 linfocitos, polimorfonucleares o células estromales. Como control externo se han utilizado hepatocitos de rata preparados por la casa Becton-Dikinson ® en portas de calibración (Fig III-2). Sobre estos portas conteniendo el control externo se depositó la muestra de núcleos de cada tumor y de esta forma se aseguró que los núcleos control y los de cada muestra han sido sometidos a las mismas condiciones durante la tinción.

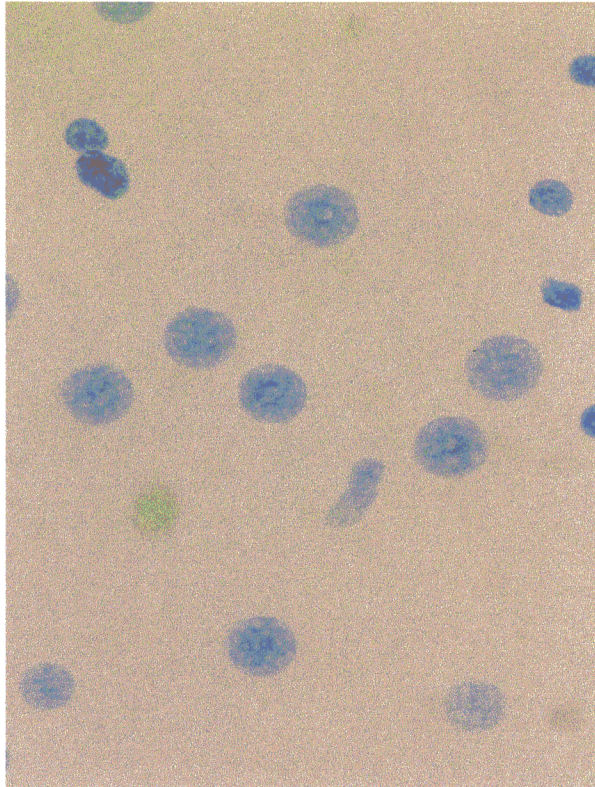


Fig III-2.- Técnica de Feulgen. A: Control de hepatocitos de rata.

Antes de medir los núcleos tumorales, es necesario establecer un control externo midiendo al menos 20 núcleos del control, lo que asegura que la tinción realizada está en condiciones óptimas. El coeficiente de variación de este control externo no superó en ningún caso el 3%. La medida de los núcleos de la muestra se realiza por un método semiautomático interactivo que permite al observador despreciar núcleos en mal estado fragmentados o conglomerados nucleares (Fig III-3). El programa transforma automáticamente las medidas de densidad óptica, que obtiene el densitómetro, en picogramos de ADN y así se consiguió directamente un histograma que representa el contenido de ADN de los núcleos analizados. También, se obtiene automáticamente el índice de ADN (DI) de los núcleos, resultado de dividir el contenido de ADN de un núcleo neoplásico por el contenido de ADN de un núcleo diploide (7.18 pgr. en el ser humano).

Siguiendo normas generalmente admitidas (Leader, 1994) los histogramas fueron clasificados de acuerdo al DI de la población tumoral predominante y la distribución de los valores, de la siguiente forma: **DIPLOIDES: Tumores en los que el DI de la población tumoral está situado en el intervalo 0,8 y 1,12.**

- **HIPERDIPLOIDES:** Tumores en los que el DI de la población tumoral está situado entre 1,13 y 1,79.
- **TETRAPLOIDES:** Tumores en los que el DI de la población tumoral está comprendido entre 1,80 y 2,12, siempre que dicha población suponga más del 20% de los núcleos.
- **POLIPLOIDES:** Tumores en los que aparece más de una población tumoral no diploide.

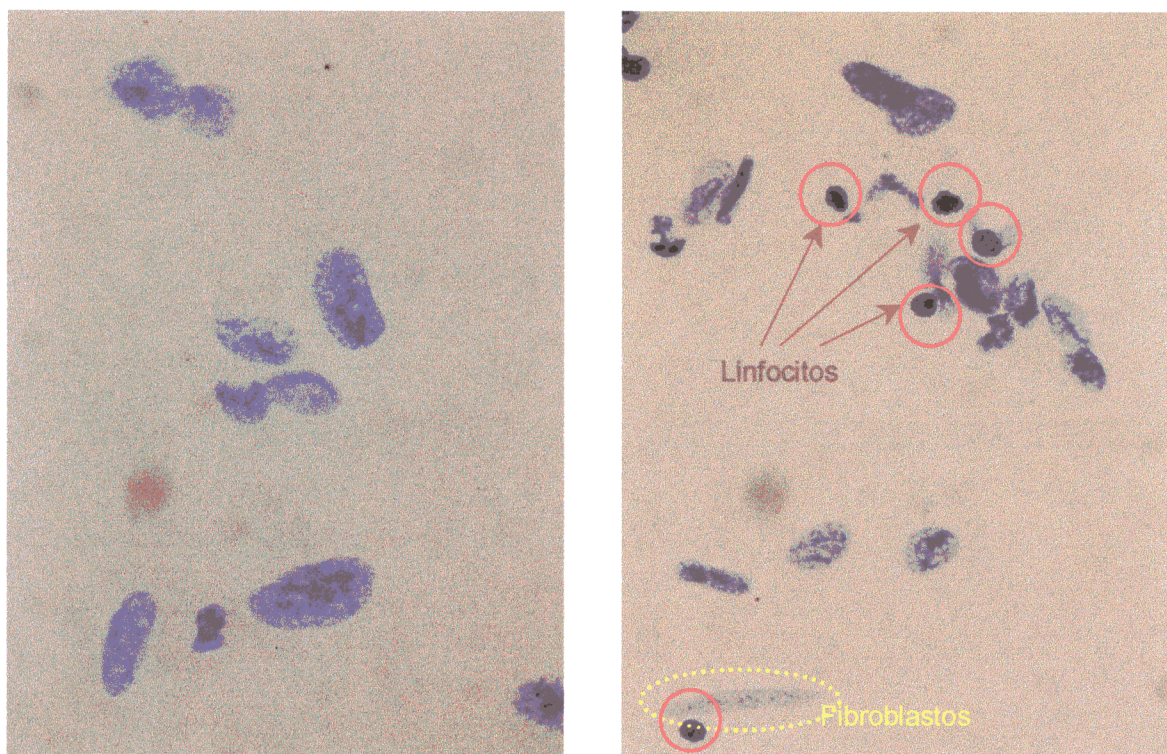


Fig III-3.- Técnica de Feulgen. A.-Ejemplo de los núcleos obtenidos en un RMS alveolar los núcleos son grandes e irregulares. B.- Ejemplo de los núcleos obtenidos en un RMS embrionario, junto a los núcleos tumorales que son ovalados o redondos aparecen núcleos del control interno : linfocitos y fibroblastos.

III.2.4.-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA.

Para la cuantificación de la fracción de crecimiento de la neoplasia se utilizó el Ac monoclonal **MIB-1** de Immunotech® que reacciona con el Ag nuclear Ki-67 asociado a la proliferación nuclear y al desarrollo del ciclo celular (fase G₁ tardía, S, G₂ y M) y ausente en la fase de reposo nuclear (G₀) y fase G₁ temprana.

III.2.4.1. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA.

La técnica IHQ se realizó sobre secciones tratadas previamente a la inmunotinción, para

facilitar el acceso de los anticuerpos a los antígenos tisulares. En la mayoría de los casos y siempre que fue posible, se utilizó el mismo bloque de parafina que para la determinación del ADN. Se utilizó un método no enzimático (Shi 1991, Mckee 1993) de desenmascaramiento de antígenos, que consiste en calentar las preparaciones en un horno microondas sumergidas en un tampón 0,01 M de citrato sódico a pH 6, durante un tiempo de 10 a 30 minutos.

Se empleó la técnica del complejo avidina-biotina (ABC) (Cattoreti 1988). Las secciones de parafina se montaron sobre portas tratados con poli-L-lisina, siendo desparafinadas y rehidratadas en alcohol. Con objeto de inhibir la peroxidasa endógena, las secciones se incubaron en una solución fresca de metanol al 5% de H₂O₂ durante 10-15 minutos, en cámara húmeda. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido adecuadamente en tampón tris-salino (TBS) durante 30 minutos, se lavaron con TBS durante 5 minutos y se cubrieron con el complejo estrepto avidina-biotina, marcado con peroxidasa (Strep AB HRP) diluido al 1/250. Tras un nuevo lavado con TBS durante 5 minutos, se incubaron en una solución de fast red (Sigma®) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, tras un último lavado con TBS durante 5 minutos se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 2-5 minutos y se procedió al lavado con agua y diferenciación con alcohol para luego deshidratar, clarificar y montar.

III.2.4.1.- PROGRAMA DE PROLIFERACIÓN NUCLEAR.

Antes de proceder a la cuantificación del índice de proliferación celular, se valoró en todos

los casos la calidad de la técnica IHQ y se seleccionaron las áreas con más cantidad de núcleos por campo y mayor actividad proliferativa (“áreas calientes”), evitando mediciones en áreas periféricas, zonas desvitalizadas, con necrosis o artefactos.

El analizador de imagen CAS-200 ® valora la actividad proliferativa en el programa de índice de proliferación (“Quantitative proliferation index”). En este programa se selecciona la opción de cuantificación sobre improntas, extensiones o cortes histológicos y antes de iniciar la medición se calibran las cámaras y el analizador, ajustando los sensores de las dos cámaras incorporadas al microscopio. Este paso se lleva a cabo con el objetivo enfocado en un área libre de tejido.

Finalizados estos ajustes se procede a cuantificar la actividad proliferativa de las células parenquimatosas neoplásicas. El programa calcula automáticamente el área nuclear positiva en relación con el área nuclear total, expresando el resultado en tantos por ciento. En cada tumor se han medido como mínimo 1500 células. Para la valoración estadística, el IPC se estratificó en dos grupos, en función del punto de corte con mayor asociación estadística: IPC bajo: Menos de 19% de células positivas e IPC alto: a partir de 19% de células positivas (Lámina III-1).

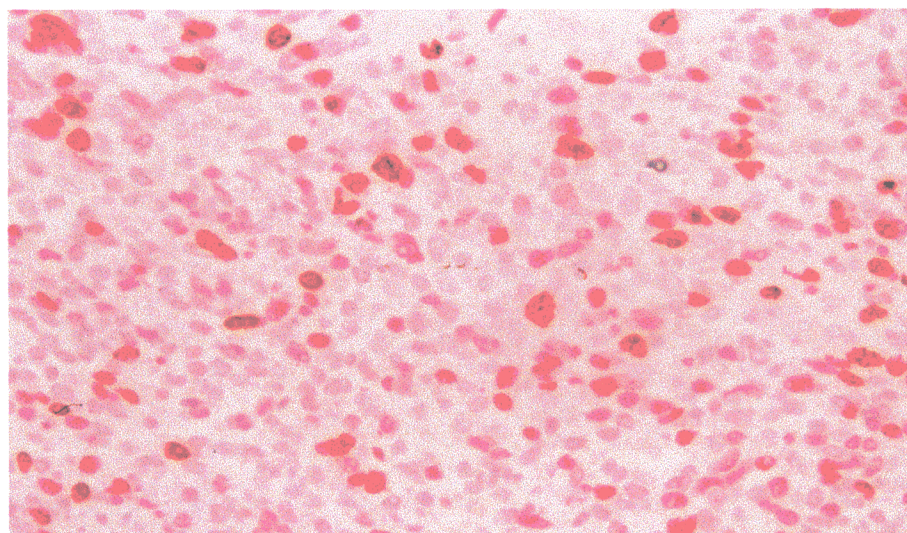
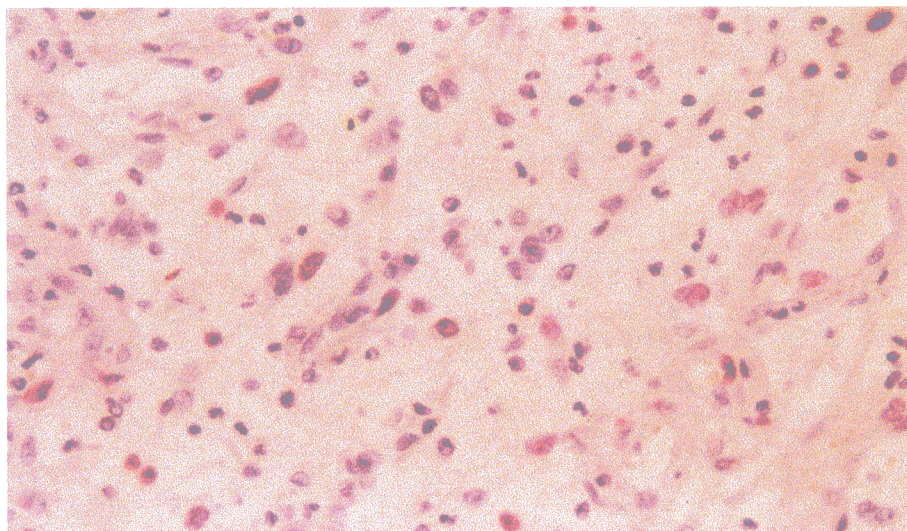


Lámina III-1.-A.Fracción de crecimiento celular. Los núcleos de las células neoplásicas muestran inmunopositividad esporádica con Ac MIB-1 (IPC<19%). B. Fracción de crecimiento celular. Los núcleos de las células neoplásicas muestran elevado porcentaje de células positivas (IPC>19%).

III. 3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se elaboró un fichero de base de datos en el programa informático DBASE IV ® para recoger los resultados de las variables estudiadas. Las variables que se consideraron en cada caso fueron las siguientes:

- **Clínicas**: Edad, sexo, localización, estadio clínico, supervivencia e intervalo libre de enfermedad (ILE).
- **Histológicas**: Tipo histológico.
- **Morfométricas**: Ploidía e índice de proliferación celular (IPC).

Como medidas descriptivas, se han empleado la media, la desviación estándar y la mediana para las variables cuantitativas (edad, supervivencia, ILE, IPC) y las proporciones para las variables cualitativas (sexo, localización, estadio clínico, tipo histológico, ploidía).

La asociación entre las distintas variables se investigó mediante análisis de tablas de contingencia, prueba basada en la χ^2 . Previamente las variables fueron estratificadas de la siguiente forma:

- Edad (mayor o menor de 8 años).
- Localización (favorable o desfavorable) según criterio del IRS y el INC.
- Estadio clínico (I, II, III, IV).
- Tipo histológico (embrionario o alveolar). En el tipo embrionario se incluyeron los RMSs botrioides y de células fusiformes.
- Ploidía (diploide, hiperdiploide, tetraploide, poliploide)
- IPC (superior o inferior al 19%)

Para el punto de corte de las variables cuantitativas continuas (edad e IPC) se escogió el que mostraba mayor significación estadística con el pronóstico.

En el análisis multivariable, la influencia de las distintas variables en la supervivencia y en el intervalo libre de enfermedad se analizó por el método de Kaplan y Meier, y las diferencias se compararon con el test log-rank.

Para el análisis multivariable se utilizó el modelo de **regresión de Cox**, determinando el

riesgo relativo, su significación estadística y el intervalo de confianza. En el modelo máximo se incluyeron todas las variables que en el análisis univariable habían demostrado relación estadística con la supervivencia o con el ILE. Las variables se codificaron como en el análisis de tablas de contingencia, excepto la ploidia que se aplicó como variables “dummy”, usando la categoría diploide como referencia y la categoría diploide y poliploide se colapsaron en una sola por prueba de colinealidad.

Como estrategia de modelización se usó una “estrategia hacia atrás” y se empleó el cociente de los logaritmos de verosimilitud como estadística para comparar modelos y evaluar la bondad del ajuste (Abraira, 1996).

Por último, se empleó el paquete estadístico **PRESTA** ® (Abraira y Zaplana, 1984) y en todas las pruebas se consideró como significativo un error alfa <0.05 .

ABRIR IV.- RESULTADOS

